



UNIVERSITA' DI PISA

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Scienze Biologiche

Tesi di laurea

**“La valutazione del rischio virologico legato a matrici
ambientali: la problematica degli indicatori”**

Relatore

Prof.ssa Annalaura Carducci

Candidata

Laura Bandini

Anno Accademico 2006 - 2007

Sommario

RIASSUNTO	5
ABSTRACT	8
1. INTRODUZIONE	11
1.1. Virus e loro principali vie di eliminazione	11
1.2. La sopravvivenza dei virus nelle varie matrici ambientali	16
1.3. Veicoli di trasmissione dei virus nelle diverse matrici ambientali	22
1.4. L'analisi del rischio	27
1.5. Il monitoraggio e la problematica degli indicatori	32
1.6. Torque- Teno Virus	38
1.6.1 Cenni Storici	38
1.6.2. Caratteristiche	39
1.6.3 Patogenesi e epidemiologia	41
1.6.4. Vie di trasmissione ed eliminazione	43
1.6.5. Presenza di TTV nell'ambiente	45
2. SCOPO	46
3. MATERIALI E METODI	49
3.1. Monitoraggio dell'ambiente ospedaliero	50
3.1.1. Ricerca dei virus a DNA su superfici	52
3.1.2. Ricerca di virus a RNA su superfici	55
3.1.3. Ricerca di virus in aerosol	56
3.1.4. Reazioni di PCR e RT-PCR per la ricerca di TTV, HCV, Adenovirus, Rotavirus e Norovirus gtp I e gtp II.	59
3.1.5. Ricerca dell'emoglobina su superfici	70
3.1.6. Ricerca della Carica Batterica Totale su superfici e in aerosol	72
3.2. Monitoraggio delle matrici ambientali	74
3.2.1. Analisi dei corpi idrici	76
3.2.2. Estrazione degli Acidi Nucleici e Ricerca del Genoma Virale.	79
3.3. Ricerca dei Colifagi Somatici	83
3.3.1. Ricerca degli Indicatori Batterici	84
3.4. Prove di resistenza del genoma virale alla disinfezione su superfici	86
3.4.1 Reazione di quantificazione del genoma di TTvirus e Adenovirus con Real-Time PCR	89

4. RISULTATI	94
4.1. Monitoraggio dell'ambiente ospedaliero	94
4.1.1 Campioni di superficie	94
4.1.2 Campioni di aerosol	99
4.2. Monitoraggio delle matrici ambientali	102
4.2.1 Acque di balneazione	102
4.2.2. Acque minerali	106
4.3. Prove di resistenza del genoma virale alla disinfezione su superfici	107
5. DISCUSSIONE	113
6. CONCLUSIONI	119
7. BIBLIOGRAFIA	121
8. RINGRAZIAMENTI	137

RIASSUNTO

La valutazione del rischio di esposizione ad agenti virali è di grande importanza negli ambienti occupazionali sanitari e nelle matrici idriche, per la incidenza di patologie legate alla trasmissione di virus e per la carenza di indicatori affidabili di contaminazione ambientale.

Da alcuni anni si sta studiando il possibile impiego del TTvirus come indicatore virale nell'ambito ospedaliero, per la capacità che ha di determinare uno stato d'infezione non associato a patologie, ma presente nell'80% della popolazione sana e per la sua notevole resistenza nell'ambiente. Studi recenti hanno dimostrato che le principali vie di trasmissione del virus sono quella oro-fecale e parenterale, anche se la presenza di DNA virale è stata ritrovata in secrezioni vaginali, saliva, secrezioni nasali, suggerendo un ruolo del TTV non solo come indicatore dell'ambiente nosocomiale, associato alla presenza di sangue, ma di contaminazione virale in senso più ampio.

La non coltivabilità di questo virus rende necessario l'impiego di tecniche biomolecolari (PCR), che mettono in evidenza la presenza di genoma virale ma non sono indice della sua infettività. A tale scopo sono stati allestiti dei test di resistenza del genoma virale alla disinfezione, con prodotti impiegati per la sanitizzazione delle superfici, su piani in acciaio inox contaminati artificialmente con una quantità di virus a titolo noto. In parallelo alla ricerca di TTV per mezzo di queste prove si è ricercato un virus patogeno, l'adenovirus, per il quale può essere valutata l'infettività perché cresce su colture cellulari.

La determinazione del TTvirus è stata applicata al monitoraggio delle superfici ospedaliere e dell'aerosol, utilizzando tecniche precedentemente standardizzate. L'identificazione di questo agente virale è stata messa in correlazione con l'analisi di

indicatori classici di contaminazione biologica, quali la carica batterica totale, con la presenza di virus patogeni a trasmissione oro-fecale (norovirus genotipo I e II e rotavirus) e a diffusione aerea (adenovirus) e con indicatori di contaminazione ematica, l'emoglobina e l'HCV. Inoltre si è effettuata la ricerca di stafilococchi, miceti e *Pseudomonas* sia per le superfici che per l'aerosol, nel quale è stata rilevata, anche, la presenza di enterobatteri.

I dati ottenuti dal monitoraggio ambientale non manifestano la presenza di indicatori patogeni, fatta eccezione per un campione di superficie risultato positivo al norovirus gtp II, su 62 campioni analizzati, per il quale è stata evidenziata un'alta carica batterica. La presenza di TTV DNA è stata rilevata nel 12,90% (8/62) di punti analizzati per le superfici e solo per un campione si ha un'alta carica microbica. L'indagine di questo virus nell'aerosol ha evidenziato il 22,22% di campioni positivi (6/27), per i quali non si ha alta carica batterica, ad eccezione di un punto nel reparto del IV° Chirurgico. Inoltre la mancanza di campioni positivi a virus patogeni non mette in evidenza la possibile relazione tra questi e il TTV DNA.

Questi risultati spingono al proseguimento dell'indagine per definire il ruolo del TTV come indicatore, ampliando la ricerca alle matrici idriche.

Il monitoraggio dell'ambiente idrico si è svolto attraverso l'analisi di acque adibite a scopi ricreativi e acque minerali, che fungono da veicolo di trasmissione per virus enterici, implicati nella maggior parte delle infezioni gastroenteriche, che affliggono ogni anno la popolazione.

L'analisi delle acque di balneazione ha previsto la ricerca di TTV in associazione a quella di virus patogeni e a indicatori di contaminazione fecale (enterococchi ed *E.coli*) e virale (colifagi somatici), secondo la normativa Europea. Su 24 campioni analizzati il 16,7% è risultato positivo all'adenovirus, mentre solo il 4,7% ha mostrato positività, rispettivamente, per TTV e rotavirus. La presenza di virus non è stata

correlata né con indicatori di contaminazione fecale, né con i colifagi somatici, ad eccezione di un punto in cui si ha presenza di adenovirus e 100 UFP/100ml di indicatori fagici. La quantità di colonie messe in evidenza per gli indicatori fecali è sempre risultata inferiore ai limiti prestabiliti dalla Direttiva Europea 7/2006/CEE.

La ricerca di virus enterici e TTV, è stata effettuata su 25 campioni di acque minerali, che non possono subire trattamenti di riduzione della carica microbica perchè considerate igienicamente salutarie e sicure da un punto di vista microbiologico. Le analisi effettuate non hanno rilevato la presenza di virus, né quella di indicatori magici.

La mancanza di correlazione tra indicatori classici di contaminazione biologica e la presenza di virus risulta inefficiente per la valutazione del rischio sia in ambito di matrici idriche che in ambiente sanitario.

ABSTRACT

The risk assessment of exposure to viruses is of great importance in health occupational settings and in the water matrices, for the incidence of pathologies due to the transmission of virus and for the deficiency of reliable indicators of environmental contamination.

From some years is being studied the possible employment of TTVirus like indicator in hospital settings, for it's ability to give infection without pathologies, but present in 80% of the healthy population and for its remarkable resistance in the environment. Recent studies have demonstrated that the main ways of transmission of the virus are that oro-faecal and parenteral one, even if the DNA presence has been found also in vaginal secretions, saliva, nasal secretions, suggesting a role of the TTV not only like indicator of the hospital settings, associated to the blood presence, but of viral contamination in general.

Since this virus is not cultivable it's necessary to use biomolecular techniques (PCR), that evidence the genome presence but not the infectivity. To this aim tests of genome's viral resistance to the disinfection have been prepared, with disinfectants, on inox steel surfaces artificially contaminated with a known quantity of virus. Another pathogenic virus, adenovirus, which grows on cell coltures, has been tested in the same way.

Moreover TTV it has been searched with a monitoring in surfaces and aerosol of hospitals settings, using technical previously standardized. The identification of this virus has been correlated with the presence of classic indicators of biological contamination, such as bacterial total count, the presence of pathogenic virus with oro-faecal transmission (norovirus genotype I and II and rotavirus) and airborne pathogens

(adenovirus) and haemoglobin and HCV. Moreover it has been searched staphylococci, mycetes and Pseudomonas in surfaces and aerosol, in which it has been searched, also enterobacteries.

The data obtained from environmental monitoring do not show the pathogenic indicators presence, except for one sample of surface resulted positive for norovirus gen II on 62 samples analyzed, for which it has been found a high bacterial count. The presence of TTV DNA has been found in 12.90% (8/62) of surfaces analyzed and only in one sample has an high bacterial count. The research of this virus in the aerosol showed 22.22% of positive samples (6/27), for which there wasn't high bacterial count, except for one point in the IV° Surgical unit. Moreover was not possible correlated the TTV DNA with the presence of pathogenic virus because they has not been found in the samples.

These results suggest to continue the study in order to clarify the role of TTV like indicator, searching TTV in water matrices too.

To this aim it was been monitoring recreative and mineral waters, that are vehicle of transmission for enteric virus, and causing many gastroenteritis every year in the population.

In bathing waters has been searched TTV, pathogenic virus, indicators of faecal contamination (enterococchi and *E.coli*) and somatic coliphages, according to European normative. Of 24 samples analysed, the 16.7% was positive for adenovirus, while only the 4.7% was positive, respectively, for TTV and rotavirus. The presence of virus has not been correlated neither with indicators of faecal contamination, neither with somatic coliphages, except for one sample positive for adenovirus and coliphages indicators (100 UFP/100ml). The faecal indicators was always below the limits of European Directive 7/2006/CEE.

In 25 mineral water samples has been searched enteric and TTV viruses. This type of water cannot be treated for the bacterial count reduction because considered hygienically healthy and safe from a microbiological point of view. The analyses have not found the presence of virus, neither that one of phagic indicators.

The lack of correlation between classic indicators of biological contamination and the presence of virus results insufficient for the risk assessment both for water matrices and health settings.

1. INTRODUZIONE

1.1. Virus e loro principali vie di eliminazione

La diffusione dei virus patogeni per l'uomo è correlata sia alla via di eliminazione attraverso la quale vengono immessi nelle diverse matrici ambientali, sia al grado di resistenza a fattori naturali ed artificiali di disinfezione.

I virus sono organismi che necessitano di un ospite per potersi replicare, determinando uno stato infettivo nell'uomo o nell'animale (Carter 2005), questi riversano l'agente infettante nell'ambiente attraverso molteplici vie di eliminazione, tra le quali le più rilevanti quella fecale), quella ematica e quella aerea.

La notevole rilevazione di patologie gastroenteriche, che colpisce ogni anno migliaia di soggetti, è legata a infezioni dovute a virus enterici, che hanno la capacità di replicarsi nell'intestino umano, dal quale vengono escreti attraverso le feci per settimane (Wallace et al., 1999; Koopmans et al., 2002). Quelli più frequentemente ritrovati nelle feci e di notevole interesse per la salute pubblica sono più di 140 tipi, tra i più diffusi si possono nominare gli enterovirus, gli adenovirus tipo 40 e 41, i rotavirus, i noravirus genotipo I e II, gli astrovirus e i virus dell'epatite A ed E (Metcalf et al., 1995).

Dati epidemiologici evidenziano che la eliminazione di questi virus avviene in alte concentrazioni, 10^{10} particelle virali per grammo nel caso di rotavirus, 10^6 per gli enterovirus e di 10^8 per HAV (Feachem et al. 1983, Yates et al. 1988, Gerba, 2000) (Tabella 1.1_1).

I principali virus a trasmissione ematica sono capaci di dare una persistenza viremica durante la fase acuta dell'infezione e si trasmettono attraverso il contatto con

sangue infetto, con superfici o materiali contaminati e per mezzo dell'aerosol. Oltre a questi virus sono da ricordare quelli delle febbri emorragiche appartenenti a molteplici famiglie Arenoviridae, Bunyaviridae, Filoviridae, Flaviviridae, essi provocano patologie con rilevante viremia e si trasmettono per mezzo del sangue e derivati a seguito di contatto diretto tra malati negli ospedali e incidenti avvenuti, anche in laboratori, attraverso manipolazione di materiale infetto (Aitket et al., 2001) (Tabella 1.1_2)

Alcuni virus si trasmettono attraverso la via aerea, come i virus influenzali, parainflenzali, il virus respiratorio sinciziale (RSV), l'adenovirus, il virus del morbillo, della rosolia e della parotite (Tabella 1.1_3), i quali si diffondono facilmente e manifestano un breve periodo di incubazione (da 1 giorno a 8 giorni). L'eliminazione di questi agenti virali dall'ospite avviene per mezzo di "goccioline" di saliva o colpi di tosse, che si diffondono nell'ambiente in base alle loro dimensioni. Piccole particelle virali possono diffondersi più facilmente nell'aria rispetto a particelle di dimensioni più grandi che sono legate alla vicinanza tra una persona e l'altra e vengono trasmesse per diretto passaggio del virus su mucose, nasali o oculari, di un'ospite suscettibile. Questi virus, a differenza di quelli emato- trasmessi e di quelli a diffusione fecale, sono stagionali, manifestano picchi di incidenza nei periodi invernali (Aitket et al., 2001).

Tabella 1.1_1: Virus eliminati dall'uomo attraverso diverse vie

FAMIGLIA	GENERE	SPECIE	MALATTIE ASSOCIATE	DIMENSIONI (nm)	GENOMA	VIA DI ELIMINAZIONE
Picornaviridae	Enterovirus	Poliovirus	Poliomielite paralitica, meningite asettica...	30	ssRNA	Fecale
	Enterovirus	Coxsackievirus A	Meningite asettica, encefalite	30	ssRNA	Fecale
	Enterovirus	Coxsackievirus B	Meningite asettica, endocardite, pericardite acuta	30	ssRNA	Fecale
	Enterovirus	Echovirus	Meningite asettica, gastroenterite acuta	30	ssRNA	Fecale
	Enterovirus	Enterovirus 68-71	Affezioni respiratorie acute	30	ssRNA	Fecale
	Hepatovirus	HAV	Epatite virale A	30	ssRNA	Fecale
Hepeviridae	Hepevirus	HEV	Epatite virale E	30	ssRNA	Fecale
Caliciviridae	Norovirus, Sapovirus	NLV,SLV	Diarrea, vomito, gastroenteriti acute epidemiche	31-35	ssRNA	Fecale
Reoviridae	Rotavirus	Rotavirus	Diarrea infantile, vomito	70	dsRNA	Fecale
	Orthoreovirus	Reovirus	Non accertata	75-80	dsRNA	Fecale
Adenoviridae	Mastoadenovirus	Adenovirus	Affezioni respiratorie, congiuntivite epidemica, gastroenteriti (tipo 40-41)	60-90	dsDNA	Fecale e Respiratoria
Astroviridae	Astrovirus	Astrovirus	Diarree infantili	28	ssRNA	Fecale
Coronaviridae	Coronavirus	HCov-229E HCov-OC43 SARS-HCov	Affezioni respiratorie, polmonite atipica, gastroenteriti	80-130	ssRNA	Fecale e Respiratoria

Tabella 1.1_2: Virus a trasmissione ematica

FAMIGLIA	GENERE	SPECIE (SIEROTIPI)	MALATTIE ASSOCIATE	DIMENSIONI nm	PRESENZA RIVESTIMENTO PERICAPSIDICO	GENOMA
Retroviridae	Lentivirus	HIV (2)	Immunodepressione (AIDS)	90-120	Rivestiti	ds RNA
Flaviviridae		HCV	Epatite, carcinoma epatocellulare	45-50	Rivestiti	ss RNA
	Flavivirus	Dengue virus Virus della febbre gialla	Febbri emorragiche	45-50	Rivestiti	ss RNA
Hepadnaviridae	Hepadnavirus	HBV (10)	Epatite	40-48	Rivestiti	ds DNA
Arenaviridae	Arenavirus	Virus Junin Virus Lassa Virus Machupo	Febbri emorragiche, meningiti	110-130	Rivestiti	ds RNA
Bunyaviridae	Bunyavirus	Hanta virus Virus della febbre emorragica Crimea Congo	Febbri emorragiche, encefaliti	90-120	Rivestiti	ds RNA ss RNA
Filoviridae	Filovirus	Ebola virus Marburg virus	Febbri emorragiche	80	Rivestiti	ss RNA

Tabella 1.1_3: Virus ad eliminazione aerea

FAMIGLIA	GENERE	SPECIE (sierotipi)	MALATTIE ASSOCIATE	DIMENSIONI μm	PRESENZA PERICAPSIDE MEMBRANOSO	GENOMA
Picornaviridae	Rhinovirus	Rhinovirus (40)	Raffreddore	30	Non rivestiti	ss RNA
Orthomyxoviridae	Influenzavirus	Influenza virus A Influenza virus B Influenza virus C	Affezione respiratorie, superinfezioni batteriche	80-120	Rivestiti	ss RNA segm.
Paramyxoviridae	Paramixovirus	Parainfluenzavirus (4)	Affezioni app. respiratorio sup. e inf.	150-300	Rivestiti	ss RNA
	Rubulavirus	Virus della parotite (1)	Ingrossamento ghiandole (parotite), infezione sistemica	150-300	Rivestiti	ss RNA
	Morbillovirus	Virus del morbillo (1)	Esantema, complicanze (PESS, encefalite, otite)	150-300	Rivestiti	ss RNA
	Pneumovirus	RSV (2)	Affezioni app. respiratorie sup. e inf.	150-300	Rivestiti	ss RNA
Togaviridae	Rubivirus	Virus della rosolia (1)	Esantema, linfadenopatia, complicanze (encefalomielite postinfettiva)	70	Rivestiti	ss RNA
Parvoviridae	Parvovirus	Parvovirus B19	Eritema infettivo	18-26	Non rivestiti	ss DNA

1.2. La sopravvivenza dei virus nelle varie matrici ambientali

La sopravvivenza virale nell'ambiente è legata a molteplici fattori di tipo chimico, fisico e biologico e al tipo di matrice.

I parametri chimici che agiscono sui virus sono:

- **la salinità e il pH**, hanno attività virucida, in quanto agiscono sul capsido proteico del virus;
- **la presenza di sostanze organiche** sulle quali il microrganismo può adsorbirsi rimanendo protetto e la possibile presenza di attività algale e batterica che possono produrre sostanze virucide (tabella 1.2_1);
- **Sostanze alchilanti, denaturanti ed ossidanti** possono inattivare o frammentare il genoma virale, riducendo la sopravvivenza del virus nella matrice

Tra i parametri fisici che agiscono sulla sopravvivenza dei virus è importante ricordare la temperatura:

- **La temperatura**: mostra una maggiore resistenza dell'acido nucleico a 30°C per più di 60 giorni, rispetto alla presenza di virus infettante che persiste per un periodo inferiore a 19 giorni (Labelle et al., 1979; Griffin et al., 2003, Breind et al.1971, Pancorbo et al. 1987, Ward et al., 1986, Gassiloud et al., 2003). Questi studi evidenziano come alte temperature, generalmente, hanno azione inattivante sul virus, mentre temperature al di sotto dei 4°C agiscono proteggendo il genoma virale;

- **La pressione atmosferica, idrostatica ed osmotica** agisce modificando la percentuale di umidità relativa, in base alla quale si può determinare protezione o inattivazione del virus;
- **Le radiazioni ultraviolette:** agiscono danneggiando il DNA dei virus.

Tra i parametri biologici si hanno:

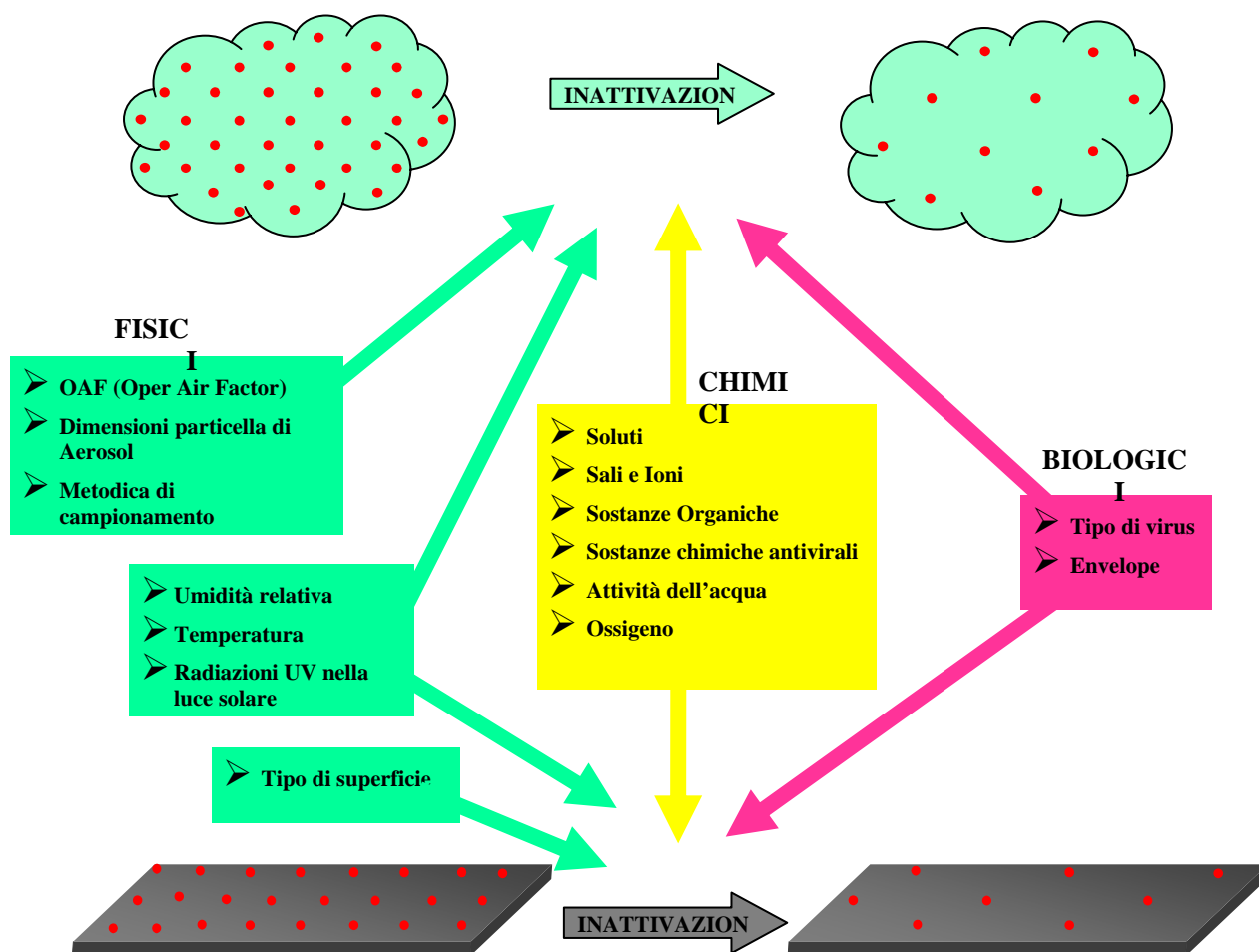
- **Gli inibitori metabolici**, i quali agiscono sulla capacità del virus di produrre energia.

Tabella 1.2_1: **Sopravvivenza di alcuni virus enterici nell'ambiente**

VIRUS	MATRICE	SOPRAVVIVENZA	TEMPERATURA	RIF. BIBLIOG.
Adenovirus 40	Acqua di mare	77g	15°C	Schwartzbrod 2003
Adenovirus 41	Acqua di mare	85 g	15°C	Schwartzbrod 2003
Calicivirus felini	Acqua di mare	30 g	≤ 10°C	Kadoi et al. 2001
Poliovirus 1	Acqua di mare	6 g	22-25°C	Rao et al 1984
	Sedimenti	19 g	22-25°C	
	Solidi sospesi	19 g	22-25°C	
	Sedimenti superficiali	19 g	22-25°C	
Poliovirus 1	Acqua di mare	1-3 g	28°C	Wait et al. 2001
		10 g	6°C	
Parvovirus	Acqua di mare	1-3 g	28°C	Wait et al. 2001
		10 g	6°C	
Rotavirus SA11	Acqua di mare	9 g	22-25°C	Rao et al 1984
	Sedimenti	19 g	22-25°C	
	Solidi sospesi	19 g	22-25°C	
	Sedimenti superficiali	19 g	22-25°C	

La sopravvivenza dei virus in altre matrici, come l'aria e le superfici è influenzata da diversi fattori fisici, chimici e biologici, inoltre dipende dalle caratteristiche del virus stesso, che può presentare un'azione protettiva o inattivante (Gantzer et al., 2002 e Carter 2005) (Figure 1.2.2_1).

Figura 1.2.2_1: **Fattori che influiscono sulla sopravvivenza dei virus nell'aerosol**



Gli agenti che agiscono inattivando i virus in aria sono:

- **La presenza di soluti**, nel mezzo di sospensione utilizzato per l'aerosolizzazione, favorisce la stabilità dell'infettività virale in relazione alla umidità relativa;
- **I sali e gli ioni**, in alte concentrazioni hanno un effetto antivirale sulla maggior parte dei virus;
- **L'attività dell'acqua**, è caratterizzata da una parte libera e da una parte legata, che permette l'adsorbimento dell'agente infettante; entrambe influiscono sulla sopravvivenza dei virus, così come le

componenti delle particelle di aerosol e l'inquinamento atmosferico stesso (Benbough, 1971);

- **Le sostanze organiche**, di tipo colloidale e solide disciolte, proteggono e stabilizzano il virus sia in matrici fecali che in materiale organico naturale;
- **L'ossigeno**, può avere un ruolo nella identificazione della infettività del virus;
- **Le sostanze chimiche antivirali**, come la fluerescina in associazione a luce solare, con una umidità relativa del 30% e del 60% agiscono con effetto negativo sulla sopravvivenza del virus dell'encefalite equina venezuelana in aerosol (Berendit et al., 1971);
- **L'umidità relativa**, può determinare un aumento della persistenza dei virus sia a bassi valori, se il virus presenta un alto contenuto lipidico, sia in alte percentuali, se l'agente infettante ha un basso contenuto lipidico; inoltre l'umidità relativa agisce, anche, sui funghi e sui batteri (Kramer et al., 2006);
- **La temperatura**, nella maggior parte dei casi determina una relazione inversamente proporzionale con il virus, il quale generalmente non resiste all'essiccamento. Nel valutare l'azione di questi parametri dobbiamo tener conto delle caratteristiche dei virus e dell'umidità relativa;
- **La luce solare**, è composta da raggi ultravioletti, soprattutto UVA (320-400 nm), che hanno suscettibilità diversa sui rispettivi agenti virali;

- **OAF (Open Air Factor)**, stabilisce la persistenza di batteri nell'aerosol di ambienti aperti e nell'aerosol di laboratori. Prende in considerazione l'insieme di fattori fisici e chimici;
- **La dimensione delle particelle di aerosol**, se di piccole dimensioni determinano una rapida inattivazione del virus;
- **I fattori biologici**, quali la presenza dell'involucro lipidico hanno un ruolo importante nella resistenza dei virus nell'ambiente. Virus "nudi", privi, cioè, di envelope, sono più resistenti rispetto a quelli che lo presentano.

A livello delle superfici oltre ai parametri che influenzano la ricerca di virus in aerosol, dobbiamo prendere in considerazione altri fattori:

- **Il mezzo di sospensione**, agisce sulla sopravvivenza dei virus determinandone una inattivazione per il poliovirus, senza, però, agire sulla sua vitalità, in materiale fecale, e risulta avere un ruolo protettivo nei confronti di rotavirus;
- **Sostanze chimiche antivirali**, quali i composti quaternari dell'ammonio che sono impiegati nella disinfezione delle superfici vista la loro importanza nel prevenire la contaminazione virale in ambiente ospedaliero, in seguito a studi effettuati sul poliovirus. La disinfezione dall'HAV, su fornice, mediante disinfettanti commerciali risulta insufficiente (Abad et al., 1997);
- **L'adsorbimento**, Alcuni studi hanno dimostrato che l'adsorbimento di virus su determinati materiali determina una maggiore resistenza dello stesso (Abad et al., 1994);
- **Il tipo di superficie**, la porosità della superficie può influenzare l'adsorbimento delle particelle virali.

Recenti studi hanno verificato la persistenza di patogeni nosocomiali su superfici inanimate in correlazione con la presenza di batteri gram- positivi (Enterococchi e *Staphylococcus aureus*) e gram- negativi (*E.coli* e *Pseudomona aeruginosa*). Queste analisi hanno evidenziato una resistenza di mesi su superfici secche per batteri gram-positivi e per la maggior parte dei virus patogeni, mentre i gram- negativi riescono a sopravviverci solo per pochi mesi (Kramer et al., 2006) (Tabella 1.2.2_1).

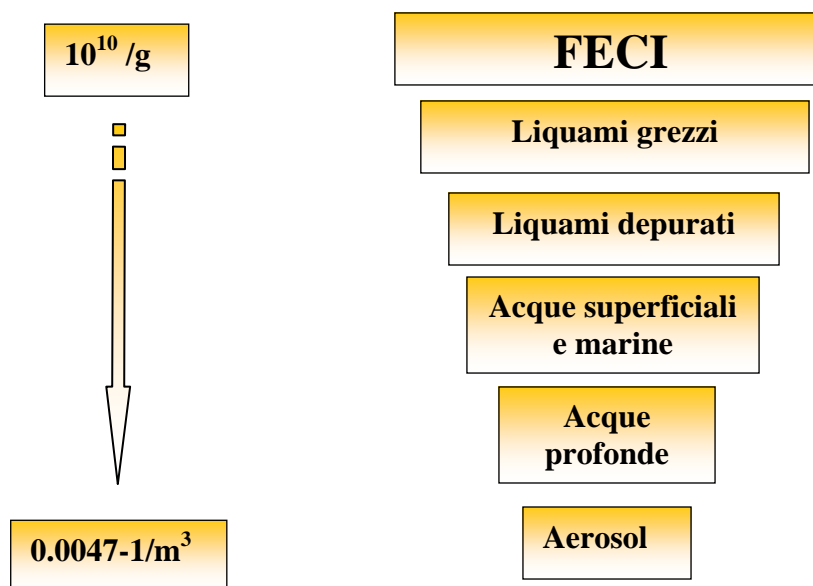
Tabella 1.2.2_1: **Persistenza di virus e batteri su superfici secche inanimate**

	MICROORGANISMO		DURATA DI PERSISTENZA	PERSISTENZA
BATTE RI	<i>E.coli</i>		1.5 ore-16 ore	Williams et al., 2005
	Enterococchi		5 giorni-4 mesi	Neely et al., 2000
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		6 ore- 16 mesi; su piani secchi 5 settimane	Panacea et al., 2005
	<i>Staphylococcus aureus</i>		7 giorni- 7 mesi	Waghenvoort et al., 2000
VIRUS	Adenovirus	7 giorni-3 mesi	Abad et al., 2001	
	Coronavirus	3 ore	Gagneuret al., 2002	
	HAV	2 ore- 60 giorni	Abad et al., 2001	
	Rotavirus	6- 60 giorni	Abad et al., 2001	

Da questi dati emerge come i batteri abbiano una maggiore resistenza dei virus nell'ambiente, per questo motivo la rilevazione della carica microbica viene utilizzata per verificare le modalità di trasmissione dei virus, per controllare le misure di prevenzione e per monitorare la situazione igienica, in maniera tale da ridurre il rischio di infezione.

L'azione dei fattori descritti per la persistenza dei virus nelle diverse matrici ambientali è affiancata all'effetto di diluizione a cui l'agente virale viene sottoposto nel percorso che svolge nell'ambiente stesso (Figura 1.2.2_2).

Figura 1.2.2_2: **Diluizione della concentrazione virale nelle diverse matrici ambientali**



1.3. Veicoli di trasmissione dei virus nelle diverse matrici ambientali

La diffusione dei virus può avvenire attraverso diversi veicoli quali l'aria, gli alimenti, l'acqua e le superfici. Queste permettono all'agente virale di entrare in contatto con l'uomo o con un altro essere vivente nel quale avviene la replicazione, che comporta, non necessariamente, uno stato patologico nell'ospite.

L'aria rappresenta uno dei maggiori veicoli di trasmissione di virus respiratori, che vengono inalati determinando un'infezione nel tratto respiratorio, a livello

orofaringeo o si possono deporre sulle superfici, attraverso le quali si verifica la contaminazione delle mani e conseguentemente delle mucose oculari.

Studi epidemiologici hanno evidenziato quanto una potenziale esposizione a virus enterici, inalati dall'aerosol, che si forma in impianti di depurazione, sia responsabile di infezioni negli operatori (Leclerc et al., 2002) (Tabella 1.3_1)

**Tabella 1.3_1: Evidenze epidemiologiche dell'esposizione ad agenti biologici
nelle aree degli impianti di depurazione**

Referenze	Individui a rischio		Metodi di indagine		Correlazioni
	Lavoratori	Popolazione	Sierologici	Epidemiologici	Esp/Inf
Rylander, 1976	X		IgG, IgM	Sewage worker's syndrome	+
Fannin, 1978		X		Infezioni respiratorie	+
Iftimovici, 1980	X		adenovirus, rotomixovirus		+
Sekla, 1980	X		17 tipi virali		+ (reovirus)
Skinhoj, 1981	X		Ab anti-HAV		+
Clark, 1981	X		Echovirus 6	Malattie gastrointestinali	+
Clark, 1981-1986	X		Ab anti-HAV, anti-HBV		+ (HAV)
Northorp, 1981		X	Ab anti-HAV e NLV		+ (Norwalk v.)
Skinoj, 1981	X		Ab anti-HAV e anti-HBV		+ (HAV)
Tilzey, 1991	X		Ab anti-HAV		+
Kosatsky, 1983	X		Ab anti-HAV		+
Lundholm, 1983	X			Dermatiti, diarrea, gastroenterite	+
Boutyn, 1987	X		IgG	Sindrome de l'égauteur, febbre, malessere, vomito	+
Scarlett-Kranz, 1987	X			Infezioni respiratorie, malattie gastrointestinali	+
Nethercott, 1988	X			Sintomi simil-influenzali	+
Prost, 1989	X			Disturbi intestinali	+
Prost, 1989	X		IgG		+
Frolich, 1983	X		Ab anti-HAV		+
Poole, 1993	X		Ab anti-HAV		+
Zuskin, 1993	X			Sintomi respiratori cronici	+
Heng, 1994	X		Ab anti-HAV		+
De Serres, 1995	X		Ab anti-HAV		-
Cadilhac, 1996	X		Ab anti-HAV		+/-
Arvanitidou, 1998	X		Ab anti-HBV	Studio caso- controllo	+
Khuder, 1998	X			Malattie gastrointestinali	+

Attraverso l'aria vengono trasportati anche virus enterici, che per inalazione determinano uno stato patologico respiratorio ed orofaringeo, con interessamento a livello intestinale. La deposizione delle particelle virali enteriche sulle superfici viene veicolata per mezzo delle mani agli alimenti.

I virus che provocano infezione enterica sono agenti ubiquitari e hanno la capacità di influenzare l'epidemiologia anche attraverso l'attività umana associata alla preparazione e distribuzione dei cibi. Il maggior rischio di infezione alimentare è caratterizzato da assunzione di prodotti ittici e in particolar modo da mitili responsabili di patologie gastrointestinali e di epatiti di tipo A (Tabella 1.3_3).

Tabella 1.3_3: Epidemie virali a trasmissione alimentare

Year	Country	Pathogen	N° cases	Food	Syndrome
1968	Michigan	HAV	63	Pastries	Hepatitis
1975	Slovacchia	TBE	10	Sheep milk	Encefalitis
1976	Australia	HAV	7	Mussels	Hepatitis
1978	UK	HAV	41	Mussels	Hepatitis
1980	Australia	Norwalk	25	Mussels	Gastroenteritis
1982	Florida	Norwalk	6	Mussels	Gastroenteritis
1984	Jugoslavia	HAV	51	Mussels	Hepatitis
1984	USA	Norwalk	3.000	Bakery products	Gastroenteritis
1985	New York	Rotavirus	122	Cold food	Gastroenteritis
1986	New York	Norwalk	1017.	Mussels	Gastroenteritis
1988	Cina	HAV	292.000	Mussels	Hepatitis
1990	New York	SRV	41	Hamburger	Gastroenteritis
1990	Usa	Norwalk	-	Lettuce	Hepatitis
1991	Japan	SRV	82	Mussels	Gastroenteritis
1991	Texas	HAV	3.000	Mussels	Gastroenteritis
1991	N. Zeland	HAV	-	Mussels	Gastroenteritis
1991	UK	HAV	50	Bread	Hepatitis
1992	USA	HAV	6	Mussels	Hepatitis
1992	USA	HAV	28	Frozen strawberries	Hepatitis
1993	Louisiana	-	82	Mussels	Gastroenteritis
1998	USA	Norwalk	15	Oyster	Gastroenteritis
2006	Austria	Norovirus	113	Chicken	Gastroenteritis

L'aria è responsabile nella diffusione di virus ematici, oltre a quelli precedentemente descritti, che depositandosi su superfici di lavoro nell'ambiente

ospedaliero, contaminano le mani , gli attrezzi da lavoro che a loro volta determinano infezioni a livello delle mucose, della pelle e del sangue (Figura 1.3_1). Nell’arco degli anni si è notato come l’esposizione ad agenti virali in ambito sanitario abbia causato infezioni fino a raggiungere il grado di epidemia nel 2004 (Lynn et al., 2004), quando attraverso lo screening di feci, è stato identificato nel 41% di medici ed infermieri il norovirus, su 41 casi analizzati. Per quello che riguarda la presenza di virus emato-trasmessi negli anni novanta si sono verificati numerosi casi di lavoratori infettati, in cui la prevalenza dell’HCV era risultata in bassa percentuale (Tabella 1.3_2).

**Tabella 1.3_2: Evidenze epidemiologiche dell’esposizione ad agenti biologici
negli ambienti sanitari**

Referenze	Operatori Sanitari (O.S.)	N° O.S.	Metodo di studio	Prevalenza
Alter, 1990	Operatori sanitari in generale	-	Questionario e screening del sangue	2% HCV +
Di Nardo, 1994	Operatori sanitari	765	Screening del sangue	0,13% HCV +
Forseter, 1993	Infermiere e pazienti di laboratorio di emodialisi	176	Screening del sangue	0,5% HCV +
Guadagnino, 1994	Medici, ausiliari, infermieri	179	Screening del sangue	6,1% HCV +
Jochen, 1992	Personale ospedaliero	1033	Screening del sangue	0,58% HCV +
Klyosawa, 1991	Medici, dentisti, infermieri, tecnici di laboratorio	349	Screening del sangue	-
Klein, 1991	Dentisti	456	Questionario e screening del sangue	1,75% HCV +
Perez, 1992	Personale ospedaliero	338	Screening del sangue	1,8% HCV +
Steel, 1992	Personale ospedaliero	-	Screening delle feci	11 degenti NLV + 1 operatore NLV +
Petrosillo, 1995	Personale ospedaliero	5813	Screening del sangue	2% HCV +
Thomas, 1993	Operatori sanitari in generale	943	Questionario e screening del sangue	0,7% HCV +
Thomas, 1996	Chirurghi dentali e dentisti	648	Screening del sangue	2% Chirurghi HCV + 0,7% Dentisti HCV +
Zuckerman, 1994	Medici, infermieri, tecnici di laboratorio	373	Screening del sangue	0,28% HCV +
Gallimore, 2004	Medici, infermieri	-	Screening delle feci	283 pazienti e operatori sanitari NLV+
Lynn, 2004	Medici	41 (1° epidemia) 24 (2° epidemia)	Screening delle feci	41% operatori sanitari NLV + (1° epidemia) 18% operatori sanitari NLV + (2° epidemia)

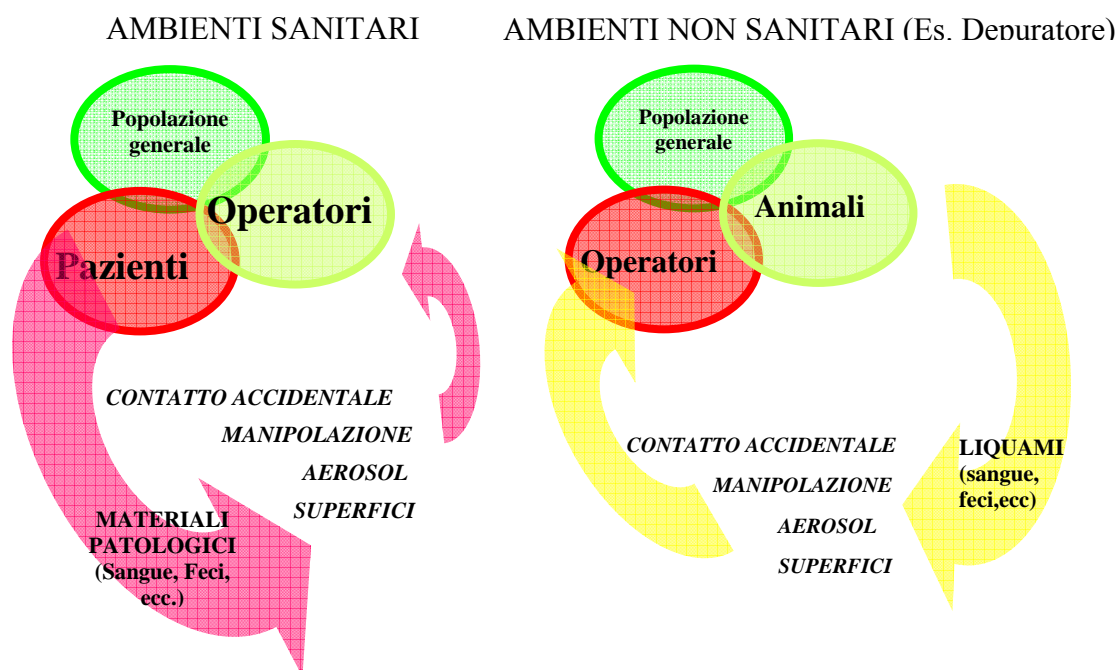
Gli agenti virali vengono veicolati anche dalla matrice idrica, la quale sta assumendo un ruolo di rilevanza nella trasmissione di virus enterici, che possono essere trasmessi all'uomo attraverso l'ingestione diretta di acque contaminate o con il consumo di prodotti ittici.

Il monitoraggio di virus enterici diffusi nell'ambiente attraverso l'acqua può costituire uno strumento di sorveglianza epidemiologica ed un metodo valido per l'analisi del rischio, in quanto responsabile delle maggiori epidemie gastroenteriche (Carducci et al., 2005) (Tabella 1.3_4).

Tabella 1.3_4: **Epidemie di origine idrica**

Referenze	Sindrome	Affetti	Ambiente idrico	Paese	Patogeni	Analisi di conferma	Evidenze epidem.
Bloch, 1990	epatite A	16	Pozzo	Georgia	HAV	Acqua	+
Audu, 2002	gastroenterite	23	Acque potabili	Nigeria	Rotavirus	Feci	+
Boccia, 2002	gastroenterite	334	Rete	Italia	Norwalk	Acqua	+
D'Angelo, 1979	faringocong.	72	Piscina	Georgia	AD4	T. cong., acqua	/
Carrique, 2003	gastroenterite	500	Rete	Svezia	Norwalk	Acqua	+
Dilawari, 1994	epatite E	1.273	Rete	India	HEV	Feci	+
Divizia, 1993	epatite A	13	Pozzo	Italia	HAV	Siero, acqua	+
Divizia, 2004	gastroenterite	2722	Rete	Albania	Rota, Adeno e Astrovirus	Siero, acqua	+
Fewtrell, 1992	gastroenterite		Fiume	UK	Enterovirus	Feci	+
Gill, 1983	gastroenterite	362	Mitili	UK	SRV	Mitili, acqua	/
Haflinger, 2002	gastroenterite	1750	Rete	Svizzera	Norwalk	acqua	/
Sung-Han, 2005	gastroenterite	516	Fiume	Korea	Norwalk	acqua	+
Harley, 2001	Faringocong.	/	Piscina	Australia	Adenovirus	T. cong.	-
Hopkins, 1984	gastroenterite	5	Pozzo	Colorado	Rotavirus	Siero	/
Kappus, 1982	gastroenterite	103	Piscina	Ohio	Norwalk	Siero, acqua	+
Khan, 1994	gastroenterite	201	Ghiaccio	Haway	Norwalk	Feci, siero	+
Kaplan, 1982	gastroenterite	1.500	Rete	Georgia	Norwalk	Siero	+
Kukkula, 1999	gastroenterite	1700-3000	Rete	Finlandia	Norwalk	Acqua	+
Lawson, 1991	gastroenterite	900	Rete	Arizona	Norwalk	Siero	+
Lenaway, 1989	gastroenterite	26	Piscina	Colorado	Ev- simili	Siero, acqua	+
Morse, 1986	gastroenterite	1.017	Mitili	New York	Norwalk	Mitili	/
Naik, 1992	epatite E	79.091	Rete	India	HEV	Siero	+
Outbreak, 1991	gastroenterite	100	Pozzo	Canada	Norwalk	Acqua	+
Nygard, 2003	gastroenterite	200	Pozzo	Svezia	Norwalk	Acqua	/
Sekine, 1989	gastroenterite	4.860	Mitili	Giappone	SRV	Feci	+
Parshionikar, 2003	gastroenterite	84	Pozzo, ghiaccio	Wyoming	Norwalk	Acqua	+
Stroffolini, 1990	epatite A	47	Acqua minerale	Italia	HAV	Siero	+
Sigari, 1994	gastroenterite	/	Rete	Italia	Norwalk	Feci, siero	+
Warner, 1991	gastroenterite	3.000	Pozzo, mitili	Texas	Norwalk	Siero	+

Figura 1.3.1_1: **Sorgenti e vie di trasmissione da matrici ambientali in ambienti di lavoro**



1.4. L'analisi del rischio

L'epidemiologia è una disciplina che studia la correlazione tra una malattia e la potenziale causa scatenante, si occupa, inoltre, di indagare sulla distribuzione e l'andamento delle patologie che affliggono la popolazione cercando di individuare i fattori di rischio che possono determinarne l'insorgenza.

I fattori di rischio rappresentano il fulcro dell'indagine epidemiologica, in quanto raffigurano gli elementi di insorgenza di una patologia cronico- degenerativa e di una malattia infettiva.

Il termine “Rischio” è stato definito nel Decreto Legislativo 626/94 concernente la valutazione del rischio di natura biologica, chimica e fisica, in ambito lavorativo:

- IL RISCHIO (Risk), è la probabilità che si verifichi un evento tale da determinare un potenziale danno, quindi la possibilità che un evento pericoloso crei una situazione di rischio;
- IL PERICOLO (Hazard), è la qualità o la proprietà intrinseca nella produzione di un danno ad opera di uno strumento di lavoro, una macchina, una sostanza, un’attrezzatura o del metodo di lavoro scelto.

L’importanza dell’analisi del rischio è legata alla ricerca di misure preventive e sistemi di comunicazione che permettano una diminuzione di infortuni ed eventi patologici in ambito lavorativo.

Questa analisi si articola in tre componenti: (Roggi et Turioni 2003):

- La valutazione, che permette una stima del potenziale danno per la salute in seguito all’esposizione a pericoli, in modo tale da poter identificare gli obiettivi raggiungibili con il controllo del rischio;
- La gestione del rischio, il cui scopo è quello di costituire delle regole che riducano l’esposizione ad un potenziale rischio, in base all’analisi fatta precedentemente, per mezzo della prevenzione e protezione;
- La comunicazione del rischio permette uno scambio di informazioni ed opinioni sul rischio tra esperti (di valutazione, gestione, etc..) e operatori, istituzioni e tutti gli enti interessati, per poter in questa maniera coinvolgere il pubblico “nel ciclo della valutazione del rischio”(Soby et al. 1993) (Figura 1.4_1).

Figura 1.4_1: **Le componenti dell'analisi del rischio.**

Nell'ambito di questa valutazione dobbiamo fare una distinzione tra quelli che sono i rischi chimici e fisici e quello che è il rischio biologico, in quanto quest'ultimo è più difficile da definire a causa delle caratteristiche legate agli agenti biologici che lo determinano.

Un'agente biologico presenta:

- a. **Capacità replicativa**, cioè la facoltà di riprodursi, che nella stima del rischio biologico assume un valore di carica minima infettante necessaria per innescare una patologia;
- b. **Infettività**, è la capacità che un microrganismo ha di replicarsi in un ospite;
- c. **Patogenicità**, capacità che ha l'agente biologico nel determinare uno stato patologico in seguito a replicazione nell'ospite;
- d. **Trasmissibilità**, è la facoltà di trasferirsi da un organismo infetto ad uno che non è stato ancora infettato;
- e. **Mutazioni**, variazioni del materiale genetico che possono aumentarne la resistenza e la capacità infettante, dovute a eventi spontanei o indotti;
- f. **Neutralizzabilità**, presenza di misure protettive volte alla prevenzione delle malattie o alla loro cura;

- g. **Interazione agente infettivo - uomo**, non dipende solo dalle caratteristiche dell'agente biologico, ma anche dalla predisposizione dell'ospite nei suoi riguardi.

Un'attenta analisi di queste caratteristiche mette in evidenza quanto sia difficile poter definire la soglia del rischio e la sua misura preventiva verso agenti biologici.

Da un punto di vista epidemiologico il rischio in questo ambito può essere determinato attraverso il calcolo dell'incidenza, in seguito alla individuazione di numerosi casi. Molti studi hanno messo in evidenza il rischio legato a significativi agenti infettanti (HCV, HBV e HIV) in funzione alle diverse modalità di esposizione (Beltrami et al. 2000; Molounghney et al. 2001).

La valutazione del rischio, in base alla gestione del rischio e all'analisi, deve essere applicata ad ogni singolo caso e deve essere calcolata la probabilità "a priori" di eventi diversi; per questo motivo la stima del rischio biologico viene determinata per mezzo della seguente formula (Goglio et al., 2002):

$$\mathbf{R = P \times E \times T}$$

Dove i vari parametri rappresentano:

R = rischio di contrarre l'infezione;

P = prevalenza dell'agente infettante nel materiale considerato;

E = frequenza d'esposizione efficace al pericolo;

T = efficacia di trasmissione dell'agente a seguito di una esposizione

Le evidenze epidemiologiche devono rientrare nella valutazione del rischio biologico e devono concentrarsi sulla diminuzione dell'esposizione agli agenti virali, in quanto non è possibile diminuire la presenza dell'agente infettante nel materiale di lavoro e nell'ambiente.

La ricerca della presenza di carica microbica nell'ambiente tende a supportare questa valutazione, in quanto si prefigge di valutare le modalità e le vie di trasmissione, il controllo della prevenzione, la condizione igienica dell'ambiente lavorativo.

Le rilevazioni analitiche nell'ambiente hanno un ruolo importante nella valutazione del rischio, secondo il D. Lgs 626/94, nel controllo attraverso misure di protezione e nella comunicazione al lavoratore.

1.5. Il monitoraggio e la problematica degli indicatori

La ricerca dei virus nell'ambiente inizia negli anni '40 con lo sviluppo dello studio epidemiologico sulla poliomielite, che dimostrò la possibile trasmissione idrica dei Poliovirus.

La presenza di questi agenti nelle acque dell'East River a New York (Melnick et al. 1947) è stata correlata con il tasso di infezioni nella popolazione. Un limite di elevata importanza, per tali analisi, era dato dall'uso di colture cellulari, che prevedevano l'inoculo dell'acqua sospetta nel tessuto cerebrale di scimmie.

A confermare la possibilità dell'acqua come veicolo di trasmissione di agenti virali è stata l'epidemia di epatite A sviluppatasi a Nuova Delhi nel 1955-1956, dove su 30.000 casi si ebbero 73 decessi.

Questi eventi epidemiologici hanno stimolato una ricerca più attenta delle tecniche necessarie per la concentrazione dei campioni, per la semina e per l'isolamento dei virus, non solo dalla matrice idrica, ma, anche da altre fonti, come gli alimenti, fra cui i molluschi e i fanghi provenienti da impianti di depurazione.

Recentemente la ricerca dei virus è stata ampliata e applicata all'aerosol che si forma a causa del moto ondoso, dell'irrigazione e del trattamento di acque reflue (Carducci et al., 2004).

Inoltre agli inizi degli anni novanta la presenza di virus a trasmissione ematica (HCV, HIV e HBV) ha posto un ulteriore problema nella valutazione della contaminazione ambientale, dovuto, anche, alle scarse tecniche utilizzate per la ricerca di tali agenti, basate unicamente sulla crescita su colture cellulari.

Con l'avvento delle tecniche biomolecolari, di recente scoperta, è stato possibile determinare la presenza di tutti quei virus che non sono capaci di replicarsi su cellule,

ma anche di quelli che possono essere coltivati, in modo tale da avere un riscontro sulla capacità infettante del virus stesso; inoltre queste metodiche ci permettono di correlare i casi e gli episodi epidemici con la contaminazione virale dell'ambiente.

La prima fase nell'analisi di un campione è la sua concentrazione, seguita dalla purificazione, che ha lo scopo di prelevare il materiale genomico del virus eliminando la componente microbica e sostanze che possono andare ad interferire con le successive tecniche di rilevazione. Queste si possono basare sulla crescita di virus su colture cellulari e sulla amplificazione di una regione del genoma dell'agente infettante con metodi biomolecolari (PCR e RT-PCR).

La semina dei virus su colture cellulari mette in evidenza la vitalità dello stesso e la sua capacità replicativa, che favorisce l'identificazione del ceppo e permette di seguire le vie di diffusione nelle diverse matrici. Tale metodica è molto sensibile ed affidabile per la ricerca degli agenti virali nell'ambiente, per questo motivo viene utilizzata come conferma delle analisi svolte con tecniche biomolecolari, per quei virus capaci di crescere su colture cellulari. Il terreno di coltura da impiegare viene scelto in base al virus che deve essere analizzato; generalmente si verifica un effetto citopatico sulle cellule coltivate, indice di replicazione virale. La veridicità del test deve essere confermata con altre due subculture, per escludere che l'effetto verificatosi sia dovuto a sostanze tossiche presenti nel campione invece che al virus.

La presenza dell'effetto citopatico è indice di infettività virale, ma non è detto che l'assenza di questo fenomeno sia legata a mancanza di agenti infettanti, perché alcuni virus sono capaci di dare infezione senza produrre effetto citopatico. Questo problema insieme al fatto che non tutti i virus si possono coltivare ha portato alla standardizzazione di metodiche biomolecolari che amplificano una sequenza specifica del genoma virale attraverso reazioni a catena della polimerasi (PCR).

Questa tecnica ha una sensibilità maggiore rispetto alle colture cellulari, anche se l'analisi può essere falsata dalla presenza nel campione di sostanze che ne alterano la ricerca del virus. Inoltre si richiede la messa a punto di tecniche di estrazione degli acidi nucleici, in maniera tale da purificare il campione dalle ribonucleasi e da enzimi diffusi nell'ambiente che interferiscono con l'estrazione del DNA o del RNA..

Nonostante la sensibilità e la specificità di questa tecnica non si può escludere la possibilità di avere dei falsi positivi a causa dell'enorme variabilità del campione ambientale, per cui un risultato positivo deve essere sottoposto ad ulteriore analisi, il sequenziamento, che permette l'identificazione della sequenza genomica a confermare o meno il risultato ottenuto. Oggi con l'avvento della Real-Time PCR è possibile quantificare il virus nelle diverse matrici ambientali.

Questa tecnica è stata applicata a prove di disinfezione su superfici contaminate artificialmente, con il TTvirus e l'adenovirus, al fine di valutare la quantità di genoma virale recuperato in seguito al trattamento con disinfettante.

I costi elevati di queste metodiche molecolari e la notevole diluizione che i virus subiscono nell'ambiente propongono l'uso di indicatori di contaminazione biologica nelle varie matrici, dall'ambiente ospedaliero a quello acquatico.

Un importante contributo alla valutazione del rischio biologico deriva dal monitoraggio ambientale, ossia la rilevazione costante della contaminazione microbica dell'ambiente preso in esame. In generale gli obiettivi del monitoraggio virologico ambientale sono:

- L'identificazione delle vie di trasmissione;
- La sorveglianza epidemiologica della circolazione virale;
- L'epidemiologia virale e gli studi filogenetici;
- La misura della contaminazione ambientale;

- La stima dell'esposizione e la valutazione del rischio;
- La valutazione dell'efficacia di misure di controllo;
- La verifica della corretta attuazione delle procedure (Educazione-Formazione).

Appare importante porre l'attenzione sulla determinazione di indicatori di contaminazione ambientale da virus a trasmissione ematica, in quanto gli agenti virali hanno una resistenza maggiore rispetto ai batteri nell'ambiente e ai processi di sanificazione. Un microrganismo per poter essere utilizzato come indicatore deve possedere le seguenti caratteristiche:

- Deve essere presenti nel sangue ed in altri fluidi biologici;
- Deve essere largamente diffuso;
- Deve avere una scarsa patogenicità;
- Deve avere una resistenza simile o superiore a quella dei patogeni correlabili;
- Deve essere facile da rilevare.

Tuttavia, il problema maggiore riguarda la rilevazione dei virus nelle diverse matrici ambientali, in quanto non è facile da effettuare, per le peculiari caratteristiche dei virus stessi, poiché:

- Hanno piccole dimensioni;
- Si ha una notevole variabilità di specie e variabilità genetica;
- Nella maggior parte dei casi danno contaminazioni multiple, in cui possono coesistere ceppi di diversa origine;
- Elevata diluizione ambientale;
- Si aggregano e si adsorbono a particelle;

- Presenza di sostanze che interferiscono con le procedure di rilevamento, riducendone l'efficienza e la specificità.

Questi motivi spingono alla ricerca di indicatori virali nelle diverse matrici ambientali (aria, acqua, superfici, sedimenti e liquami), affiancate dall'analisi di indicatori di contaminazione batterica, ematica (esclusivamente per l'ambiente ospedaliero) e la ricerca di virus patogeni, in maniera tale da poter valutare il rischio da infezioni virali.

Un indicatore deve poter essere correlato con la presenza di patogeni, deve presentare una simile sensibilità o resistenza, deve poter essere ricercato in maniera routinaria attraverso l'uso di tecniche poco dispendiose e deve presentare le seguenti caratteristiche:

1. **RAPPRESENTATIVITA'**: deve essere correlabile ad un certo fenomeno. Non deve essere mascherato da altri fattori e deve poter essere applicato a diverse situazioni;
2. **ACCESSIBILITA'**: deve essere facilmente campionabile e valutabile e deve avere una soglia di rilevabilità analitica accessibile;
3. **AFFIDABILITA'**: deve presentare il minor numero possibile di errori analitici;
4. **OPERATIVITA'**: deve essere di facile applicazione.

Gli indicatori virali che sono stati proposti fino ad ora possono essere classificati in base alla loro natura in batterici (carica mesofila, colimetria, enterococchi e clostridi), virali (batteriofagi e reovirus) e chimici (emoglobina) e secondo il tipo di trasmissione che rappresentano in generici (carica batterica mesofila), ematici (emoglobina) o enterici (colimetria, enterococchi, clostridi, batteriofagi e reovirus). Gli

agenti virali differiscono dagli altri microrganismi e tra loro, per resistenza, per le caratteristiche biologiche, per l'epidemiologia e l'ecologia. E' di fondamentale importanza studiare le similitudini dei vari indicatori con i virus, le correlazioni tra la presenza e la quantità dell' indicatore e la presenza del virus, la rappresentatività verso più tipi virali (tabella 1.5_1).

Tabella 1.5_1: **Possibili indicatori virali e loro correlazione con la presenza di virus**

INDICATORE	RESISTENZA	DIFFUSIONE	CORRELAZIONE	FACILITA' D'USO
Carica Batterica	<	Generale	+ / -	+
Colimetria	<	Simile ai virus enterici	+ / -	+
Enterococchi	< / =	Simile ai virus enterici	+ / -	+
Clostridi	>	Simile ai virus enterici	+ / -	+
Batteriofagi	?	Simile ai virus ematici	?	+
Emoglobina	< / =	Simile ai virus enterici	+ / -	+
Colifagi	= / >	Simile ai virus enterici	?	-
Reovirus	= / >	Simile ai virus ematici enterici e respiratori?	?	-
TTvirus	<	Simile ai virus enterici	+ / -	+

Nella maggior parte dei casi gli indicatori non si sono rilevati affidabili almeno per uno dei requisiti richiesti, anche se si sono verificati poche situazioni in cui è stato possibile determinare delle correlazioni (Carducci et al., 1997).

Nonostante la difficoltà nel determinare l'uso di un indicatore per diversi campi di applicazione, rende necessari ulteriori studi, ed anche adeguamenti normativi. E' importante, quindi, rivolgere l'attenzione a ricerche che favoriscano le correlazioni tra indicatori e virus patogeni, proponendo nuovi possibili indicatori

1.6. Torque- Teno Virus

1.6.1 Cenni Storici

Una nuova prospettiva per la determinazione di contaminazione virale dell'ambiente ospedaliero, ma anche di altre matrici ambientali, può essere data dall'uso del TTV come indicatore.

Il Torque- Teno Virus è stato scoperto nel 1997, da Nishizawa e collaboratori in un paziente giapponese affetto da epatite acuta post trasfusionale ad eziologia sconosciuta, nel quale venne identificato un frammento di 500 nucleotidi sconosciuto (Nishizawa et al. 1997).

La caratterizzazione successiva del genoma completo è stata identificata da Okamoto e collaboratori, che inclusero questo virus nella famiglia delle *Parvoviridae*, per le sue ridotte dimensioni (3739 basi) (Okamoto et al. 1998).

Nell'anno successivo nuove ricerche misero in evidenza la circolarità del genoma virale e la presenza di una zona ricca in GC, così che si pensò fosse più appropriato includere il TTV nella famiglia delle *Circoviridae* (Hijikata et al., 1999).

Recentemente il comitato internazionale per la tassonomia dei virus (ICTV) ha deciso di classificare il TTV in una nuova famiglia, quella degli *Anellovirus* (Bigini et al., 2005), inoltre ha mantenuto lo stesso nome TT del quale cambia, però il significato,

che nel vecchio acronimo dall'inglese significava “transfusion- transmitted virus”, mentre oggi si riferiscono a parole latine, “Torque e Teno” (collana e sottile), si parla, quindi, di Torque- Teno Virus (Maggi et al 2003).

1.6.2. Caratteristiche

Le caratteristiche chimico- fisiche del virus sono state ricavate dalla analisi di particelle virali isolate da campioni di feci e di plasma di soggetti infetti.

La particella virale ha un diametro di 30- 32 nm (Mushahwar et al., 1999) e il fatto che rimanga inalterato dopo trattamento con detergenti come il Tween 80, ci fa presupporre che il virus sia privo di involucro lipidico esterno (Okamoto et al. 1998). L'assenza di involucro è stata confermata dal ritrovamento del virus nella bile di soggetti infetti (Ukita et al., 1999), nei quali, a causa della presenza dei sali biliari, possono essere presenti solo virus privi di involucro esterno.

Il TTV rimane infettante dopo trattamento a 65° C per 96 ore con calore secco, a meno che il processo non sia più spinto o si abbia purificazione con immunoaffinità (Chen et al., 1999; Takayama et al., 1999). Queste caratteristiche mettono in evidenza la stabilità del virus, similmente ai *Parvovirus*, già impiegati come indicatori di contaminazione virali negli emoderivati (Berns et al., 1996).

Il genoma di TTV è costituito da un singolo filamento di DNA (Okamoto et al. 1998) circolare e covalentemente chiuso (Miyata et al., 1999) a polarità negativa (Mushahwar et al., 1999).

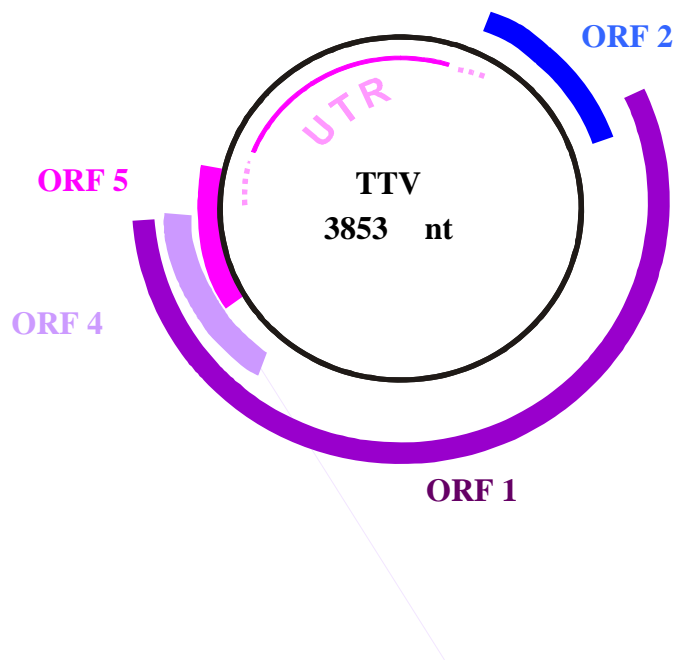
La sua lunghezza è di circa 3800 nucleotidi, in cui, all'interno del gruppo TTV, si hanno piccole differenze dovute a inserzioni e delezioni (Kamahora et al., 2000; Okamoto et al., 2000; Muljono et al., 2001). E' formato da due regioni principali, di cui una codificante (ORF) che occupa i due terzi della lunghezza totale del genoma virale

ed una non codificante (UTR) che caratterizza la parte restante del materiale genetico e che sembra avere un ruolo importante nella trascrizione proteica e nella replicazione virale (Kamada et al., 2004; Suzuki et al., 2004).

La regione codificante contiene almeno 5 geni codificanti per altrettante proteine, ORF 1, ORF 2, ORF 3, ORF 4 e ORF 5 (Takahashi et al., 2000) e risulta essere eterogenea nei diversi ceppi di TTV. La regione ORF 1 presenta 3 porzioni estremamente variabili costituite da una decina di basi, dove nel genotipo 1 la divergenza aminoacidica può raggiungere il 70% di variabilità.

La regione UTR, a differenza della ORF, è molto conservata, probabilmente per il ruolo che ha nella replicazione virale (Erker et al., 1999; Hijikata et al., 1999) (Figura 1.6.2_1).

Figura 16.2_1: **Organizzazione del genoma di TTV**



L'infezione da parte di TTV e la sua presenza nell'ambiente vengono determinate attraverso metodi biomolecolari, a causa della mancanza di metodi sierologici e della impossibilità colturale.

La variabilità del genoma e il solo utilizzo di tecniche biomolecolari hanno posto il problema nella scelta della sequenza da amplificare. In un primo momento si propose l'amplificazione della regione ORF 1, la quale risultò inefficace per l'isolamento del virus (Itho et al., 1999; Irving et al., 1999); studi successivi hanno messo in evidenza l'efficacia di tale regione nell'isolamento dei genotipi 1-6 (Muljiono et al., 2001).

Ulteriori esperimenti hanno permesso di identificare la regione non codificante come quella specifica per l'amplificazione del genoma, grazie all'elevata conservazione, che viene considerata *Universale* (Okamoto et al. 2001). All'interno di questa regione sono stati identificati siti bersaglio sia per l'amplificazione qualitativa che quantitativa, attraverso l'utilizzo di metodiche molecolari di Real- Time PCR o PCR competitiva (Maggi et al. 2001).

Anche la classificazione di TTV risulta essere complessa; recentemente alcuni studi condotti sulla regione UTR hanno messo in evidenza un notevole numero di genotipi e sottotipi (più di 40 e 70 rispettivamente), numeri, questi, che hanno la tendenza ad aumentare in seguito alla identificazione di nuovi isolati. Peg e collaboratori hanno proposto di raggruppare i ceppi in 5 genogruppi, numerandoli da 1 a 5 (Peg et al. 2000), i quali sono stati inseriti nella famiglia degli Anelloviridae, e suddivisa a sua volta in 4 generi (Jelcic et al., 2004).

1.6.3 Patogenesi e epidemiologia

Negli anni successivi alla scoperta del TTV, sono stati eseguiti degli studi sulla correlazione tra questo virus, l'epatite fulminante e l'epatite cronica ad eziologia

sconosciuta (Irschad et al., 2006), poiché si era riscontrata la presenza di TTV nel siero di soggetti affetti da tali malattie. L'ipotesi che questo virus potesse essere una causa dell'insorgenza di patologie epatiche è stata smentita (Mushahwar et al., 1999; Matsumoto et al., 1999; Ali et al., 2002) dal fatto che il TTV è stato ritrovato nell'80% della popolazione sana (Abe et al., 1999; Bendinelli et al 2001; Niel e Lampe 2001; Hino et al., 2007), questa scoperta ci porta a supporre che tale virus sia un normale commensale della flora umana o semplicemente un apatogeno (Griffiths et al., 1999; Mushahwar, 2000).

Il DNA di TTV è stato ritrovato, oltre che nel plasma e nelle feci, nel latte materno di soggetti viremici e non viremici (Okamoto et al., 1998; Yokazaki et al., 1999; Ischikawa et al., 1999), nella saliva e nello sperma (Inami et al. 2000).

L'infezione ad opera di questo agente virale è diffusa nella popolazione mondiale e non tiene conto né dell'area geografica, né dell'origine etnica e tanto meno delle condizioni socio- economiche. Studi svolti sulla popolazione generale hanno evidenziato che l'80% della stessa è portatrice sana del virus (Davallo 2004), in alcuni paesi, come l'Arabia Saudita e il Singapore, è, addirittura presente nella totalità degli abitanti (Bendinelli et al., 2001 e de Castro Amarante et al., 2007) (Tabella 1.6.3_1).

Tabella 1.6.3_1: Prevalenza della viremia da TTV nella popolazione generale di diverse aree geografiche

PAESE	% DI POSITIVITA'
Egitto	85%
Arabia Saudita	100%
Giappone	81%
Myanmar	96%
Nepal	82%
Singapore	98%
Finlandia	73%
Olanda	72%
Regno Unito	57%
Bolivia	82%

La diffusione del TTV è ubiquitaria in entrambi i sessi (Oguschi et al., 1999), risulta essere alta in bambini al di sotto di un anno (Vasconcelos et al., 2002) anche se studi recenti hanno dimostrato che tende a raggiungere un picco massimo in età adulta (Che et al. 1999).

1.6.4. Vie di trasmissione ed eliminazione

L'uomo rappresenta un serbatoio costante di infezione visto l'elevato numero di portatori cronici, inoltre la notevole prevalenza di infezione da parte di questo virus e la sua contagiosità, fanno supporre che possa trasmettersi attraverso molteplici vie, di cui quella parenterale e quella oro- fecale sono le più frequenti ed efficienti (Gallian et al., 2000; Nakagawa et al., 2000; Tawara et al., 2000; Azzi et al., 2001; Irschad et al., 2006) (Figura 1.6.4_1).

Il DNA di TTV è stato ritrovato, anche, nelle secrezioni vaginali, nei tamponi nasali, nella saliva (Osiowy et al., 2000) e nello sperma a confermare la presenza di altre vie di trasmissione del virus stesso (Gerner et al., 2000; Kazi et al., 2000; Inami et al., 2000; Liu et al., 2000; Martinez et al., 2000; Matsubara et al., 2000; Schroter et al., 2000; Stark et al., 2000; Biagini et al., 2001a; Chan et al., 2001; Fornai et al., 2001; Pirovano et al., 2002).

Uno studio recente svolto nella Clinica Pediatrica dell'Azienda Ospedaliera Pisana in bambini di età compresa tra 1 e 21 mesi affetti da insufficienza respiratoria acuta, hanno messo in evidenza un alto titolo virale di TTV nelle secrezioni nasali piuttosto che nel plasma.

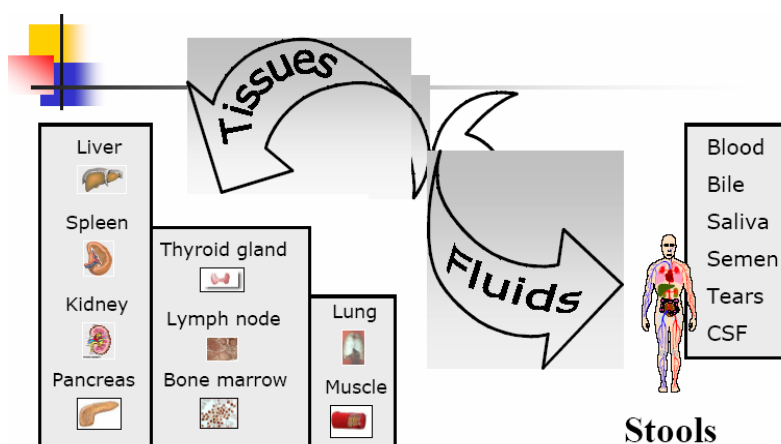
Questi risultati hanno mostrato una nuova via di trasmissione del virus e la possibilità di monitorare bambini così piccoli ha permesso di seguire la dinamica dell'infezione da TTV e il suo evolversi nel corso degli anni. Inoltre si è visto come la

trasmissione aerea possa essere un'importante via di ingresso dell'agente in questione e un ottimo sito di replicazione primaria (Maggi e t al., 2003).

La trasmissione oro- fecale del virus ha suggerito una sua ricerca nell'ambiente, soprattutto in impianti di depurazione, attraverso un'analisi delle acque in entrata (Haramoto et al., 2005); altri studi si sono proposti il monitoraggio della foce di un fiume che riceve le acque di uscita di un impianto di depurazione, in associazione con la ricerca di virus enterici patogeni (norovirus, adenovirus, rotavirus e enterovirus) (Verani et al., 2005).

I risultati ottenuti da questi studi hanno suggerito la possibilità di utilizzare il TTV come indicatore di contaminazione virale, non solo nell'ambiente sanitario, ma anche nelle diverse matrici ambientali, grazie alla sua ubiquità, alla notevole resistenza, alla rappresentatività, accessibilità, affidabilità e operatività, caratteristiche tipiche di un indicatore.

Figura 1.6.4_1: Vie di eliminazione e principali localizzazioni del TTV



1.6.5. Presenza di TTV nell'ambiente

Recenti studi effettuati sull'analisi delle acque di impianti di depurazione in India hanno messo in evidenza una elevata concentrazione di TTV nel liquame in entrata (12,7%) e una più bassa in quello in uscita dall'impianto (2%) (Vaidya et al., 2002).

Studi analoghi si sono svolti anche in Giappone, dove si è effettuata una analisi preliminare del liquame grezzo, nel quale è stato ritrovato il 97% del virus, mentre è presente nel 24% del liquame che ha subito un trattamento secondario e non è stato identificato in acque reflue che sono state sottoposte a trattamenti più avanzati (Haramoto et al., 2005).

Questi dati ci confermano che il Torque-Teno Virus è epidemico in Giappone e la sua resistenza a trattamenti di depurazione ne favorisce la dispersione nell'ambiente marino. Inoltre confermano la sua trasmissione per via oro-fecale, essendo presente in alte concentrazioni nei liquami.

La presenza di TTV è stata ritrovata, anche se con bassa concentrazione, probabilmente per la sua scarsa resistenza in ambiente acquatico, nei mitili (Myrmel et al., 2004).

2. SCOPO

La presenza di virus di derivazione umana negli ambienti sanitari e nelle acque adibite a diversi usi assume un ruolo importante nella sicurezza della salute pubblica, a causa della notevole resistenza che gli agenti virali hanno nell'ambiente stesso. L'evidenza di tale pericolo deriva da dati epidemiologici e può essere verificata per mezzo del monitoraggio ambientale, che permette di osservare le vie e le modalità di trasmissione degli agenti virali implicati nelle infezioni.

Tuttavia la ricerca diretta dei virus nell'ambiente è limitata dalla diluizione che essi subiscono, dalla variabilità della loro presenza, legata a fattori fisici, chimici e biologici, delle matrici stesse e dall'elevato costo delle tecniche di rilevazione dell'agente virale. Per ovviare a tali restrizioni appare importante l'uso di indicatori di contaminazione biologica da impiegare nel monitoraggio ambientale.

Un buon indicatore per poter essere correlato con la presenza di microrganismi patogeni, deve avere una sensibilità e resistenza ai trattamenti di disinfezione simile a quella dell'agente ricercato; inoltre deve essere facilmente identificato per mezzo di tecniche economiche, in maniera tale da poterle impiegare rutinariamente.

Purtroppo gli indicatori che sono stati utilizzati fino ad ora si sono rivelati inadeguati (Carducci et al., 1997).

Per far fronte a queste problematiche è stato proposto come indicatore di contaminazione virale il TTvirus, microrganismo che provoca una infezione persistente non patogena e che è largamente diffuso nella popolazione mondiale. Le vie di trasmissione del TTV sono molteplici; recenti studi hanno isolato il DNA virale nella saliva, nei liquidi seminali e nell'aerosol, suggerendo la presenza di altre vie di

trasmissione, oltre a quella oro-fecale e il suo ipotetico impiego come indicatore di contaminazione ambientale.

Lo scopo di questa tesi consiste nella ricerca del TTV nelle diverse matrici ambientali, dalle superfici e dall'aerosol dei reparti ospedalieri, ai corpi idrici, per cercare di validare l'ipotesi che possa essere impiegato come indicatore di contaminazione virale. In associazione alla determinazione di questo agente sono stati ricercati indicatori classici di contaminazione biologica e di virus patogeni specifici a seconda della matrice.

In ambiente sanitario sono state analizzate le superfici, per le quali in associazione alla ricerca di TTV, sono stati esaminati virus a trasmissione oro-fecale (norovirus gtp I e II, rotavirus e adenovirus) ed indicatori di contaminazione ematica, l'emoglobina e l'HCV. In associazione alla identificazione di virus, vengono ricercati microrganismi quali i miceti, gli stafilococchi, la carica batterica totale e la *Pseudomonas aeruginosa*.

La determinazione di questi agenti virali in ambiente nosocomiale è stata effettuata anche per l'aerosol, nel quale non si indaga sulla presenza di emoglobina ed oltre all'indagine di microrganismi che vengono rilevati sulle superfici, nell'aria si ricercano anche gli enterobatteri.

Il ritrovamento del TTV viene ampliato alle matrici idriche, acque di balneazione ed acque minerali, nelle quali si ricercano, virus enterici (norovirus gtp I e gtp II, rotavirus, enterovirus, HAV ed adenovirus) ed indicatori di contaminazione fecale (enterobatteri intestinali ed *E.coli*), esclusivamente per i corpi idrici a scopo ricreativo, ed indicatori di contaminazione virale (colifagi somatici).

L'identificazione di questo agente virale viene effettuata per mezzo di tecniche biomolecolari, che mettono in evidenza solo la presenza di genoma virale e non danno indicazioni sulla sua "infettività". Per questo motivo e per l'incapacità del virus di

crescere su colture cellulari sono stati allestiti dei test di resistenza del genoma virale alla disinfezione con prodotti commerciali impiegati nella sanificazione delle superfici.

3. MATERIALI E METODI

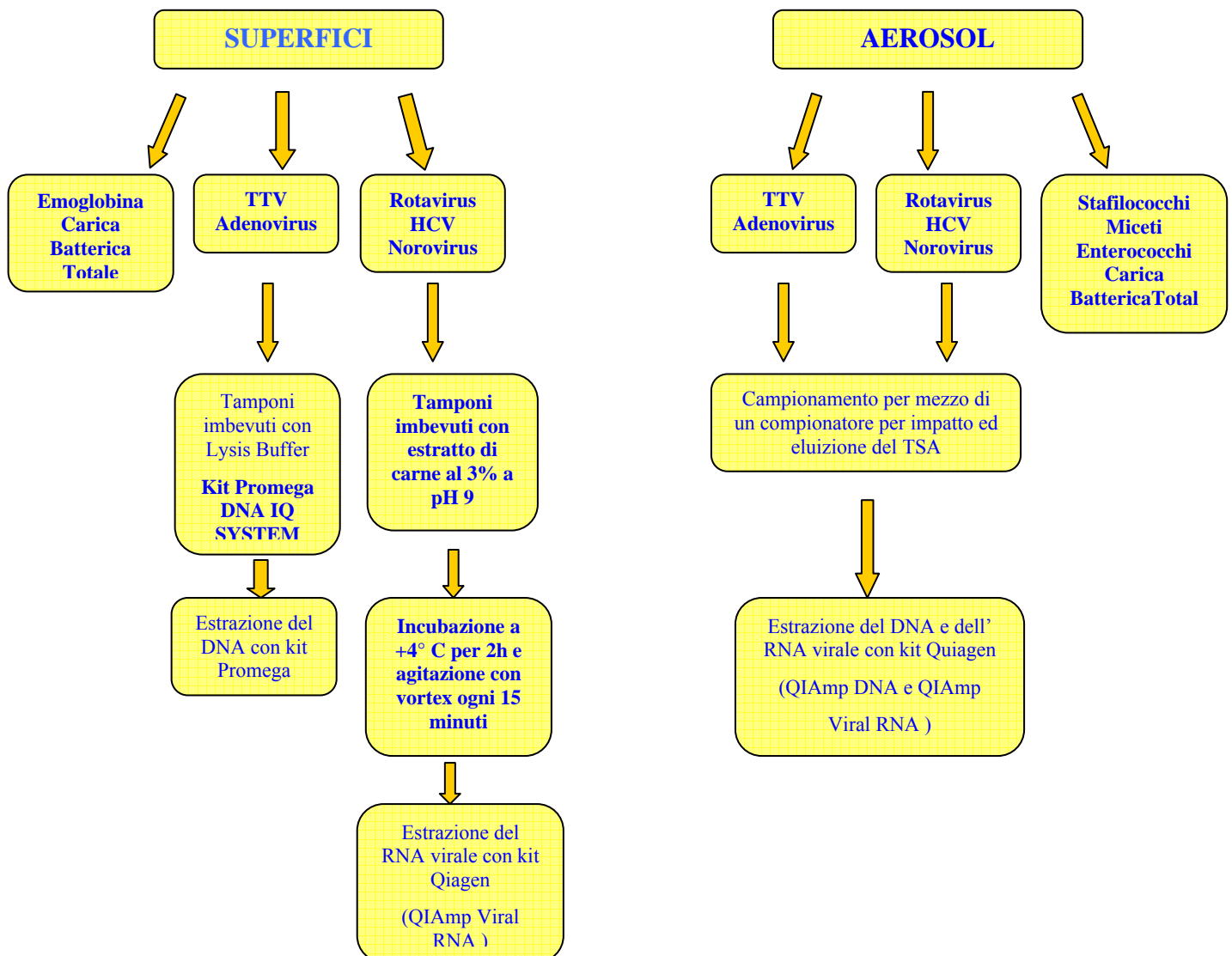
Lo studio è stato articolato nelle seguenti fasi:

1. Monitoraggio di aerosol e superfici di alcuni reparti ospedalieri per la ricerca di:
 - TTV, come possibile indicatore del rischio da esposizione da agenti virali;
 - Adenovirus, Norovirus gtp I e gtp II, Rotavirus e HCV
 - Microrganismi patogeni ad ampia diffusione ambientale, come lo *Staphylococcus Aureus*, i miceti, *Pseudomonas Aeruginosa* e gli enterobatteri (rilevati solo in aerosol)
 - Indicatori di contaminazione: ematica (emoglobina, esclusivamente per le superfici) e microbica (carica batterica totale);
2. Monitoraggio di matrici idriche:
 - Acque di balneazione, nelle quali è stata effettuata la ricerca di virus enterici, quali Norovirus gtp I e gtp II, HAV, Enterovirus, Rotavirus, Adenovirus e TTV;
 - Acque Minerali, sono state sottoposte alla ricerca di virus enterici, Adenovirus Norovirus gtp I e gtp II, Rotavirus, Enterovirus HAV e si è determinata anche la presenza di TTV.
3. Analisi delle correlazioni tra la presenza di virus nelle diverse matrici ambientali ed indicatori batterici (*E. coli*, Enterococchi, Coliformi Totali e Fecali) e Colifagi Somatici;
4. Prove di resistenza alla disinfezione del genoma virale di TTVirus e Adenovirus.

3.1. Monitoraggio dell'ambiente ospedaliero

Le tecniche biomolecolari per la ricerca di virus, standardizzate in studi precedenti, sono state impiegate per l'analisi di eventuali contaminazioni di superfici e di aerosol in vari reparti ospedalieri; in associazione alla ricerca di virus ad elevata sopravvivenza ambientale (Adenovirus, Norovirus, Rotavirus e HCV); alla valutazione della carica batterica totale, della presenza di Stafilococchi, miceti e Pseudomonas; alla presenza, esclusivamente per l'analisi dell' aerosol di Enterococchi e per le superfici di un indicatore ematico, l'emoglobina (Figura 3.1_1).

Figura 3.1_1: Schema del monitoraggio ambientale ospedaliero.



Sono stati prelevati 62 punti di campionamento per le superfici e 27 per l'aerosol
(Tabella 3.1_1 e 3.1_2).

Tabella 3.1_1: **Punti di prelievo per le superfici.**

EMATOLOGIA	1	Stanza H Parete	CENTRO USTIONI	32	Laboratorio di Manipolazione Cellulare
	2	Stanza F Parete		33	Palestra Inerno Vasca
	3	Stanza G Parete		34	Pronto Soccorso Inerno Vasca
	4	Medicheria Parete		35	Stanza 69 Comodino
	5	Stanza Sterile D Parete		36	Stanza 75 Parete
	6	Stanza H Parete	MONOBLOCCO TERAPIA INTENSIVA	37	Box 1 Carrello Medicinali
	7	Stanza F Parete		38	Box 2 Tavolino
	8	Medicheria Parete		39	Box 3 Carrello Medicinali
	9	Stanza H Parete		40	Box 4 Parete
	10	Stanza F Parete		41	Sala Operatoria 1 Lampada
	11	Stanza Sterile D Parete		42	Sala Operatoria 1 Monitor
	12	Medicheria Parete	NEUROLOGIA	43	Medicheria Parete
	13	Stanza H Tavolino		44	Medicheria Parete
	14	Stanza F Parete Bagno		45	Medicheria Carrello
	15	Stanza Sterile D Carrello		46	Stanza Parete
CHIRURGIA GENERALE	16	Medicheria Luce RX	NEUROCHIRURGIA	47	Stanza 16-17 Parete 1° Piano
	17	Stanza 58 Anta Armadio		48	Stanza 16-17 Parete 2° Piano
ODONTOIATRIA	18	Stanza 5 Parete		49	Stanza Filtro Parete Lavandino
	19	Ambulatorio Parete		50	Stanza 16-17 Armadio 1° Piano
PEDIATRIA ONCOEMATOLOGICA	20	Stanza 4 TMO Armadio Medicine	CHIRURGIA GENERALE	51	Medicheria Parete
	21	Stanza 3 TMO Parete		52	Stanza 7 Armadio
ENDOCRINOLOGIA	22	Stanza 49 Parete		53	Medicheria Cassetto
	23	Stanza 51 Parete		54	Stanza F Testata Letto
CARDIOTORACICO	24	Stanza 44 Porta	UTIC	55	Carrello
	25	Stanza 38 Tavolo		56	Stanza 12
	26	Cardiochirurgia Carrello Farmacia	OCULISTICA	57	Carrello Infermeria
	27	Pneumologia Stanza 71 Armadio		58	Stanza 1 Parete Dietro il Letto
PEDIATRIA	28	Stanza 3 Bancone	PSICHIATRIA	59	Medicheria Carrello
	29	Stanza 4 Parete		60	Bagno Lavandino
	30	Stanza 3 Porta	V° CHIRURGICO	61	Medicheria Carrello
	31	Stanza 4 Parete Bagno		62	Bagno Lavandino

Tabella 3.1_2: **Punti di prelievo per l'aerosol**

EMATOLOGIA	1	Stanza Sterile D	NEUROCHIRURGIA	15	Stanza 16-17
	2	Stanza H		16	Filtro Sala Operatoria
	3	Corridoio		17	Stanza Filtro
	4	Corridoio		18	Stanza 16-17
	5	Stanza H	CENTRO USTIONI	19	Corridoio
	6	Stanza Sterile D		20	Pronto Soccorso
	7	Stanza H	CHIRURGIA GENERALE	21	Medicheria 3° Piano
	8	Stanza F		22	Stanza F
MONOBLOCCO TERAPIA INTENSIVA	9	Box 1	PEDIATRIA ONCOEMATOLOGICA	23	Stanza 4
	10	Box 2		24	Stanza 3 TMO
	11	Box 3		25	Laboratorio di Manipolazione Cellulare
	12	Sala Operatoria 1	CARDIOCHIRURGIA	26	Farmacia
IV° CHIRURGICO	13	Subintensiva	CARDIORORACICO E PNEUMOLOGIA	27	Stanza 71
	14	Pronto Soccorso			

3.1.1. Ricerca dei virus a DNA su superfici

Il campionamento delle superfici in ambiente ospedaliero è stato effettuato con l'uso di tamponi sterili, in cellulosa, imbevuti con 250 µl di Lysis Buffer (kit Promega DNA IQ SYSTEM) e strisciati su un piano di 36 cm². Vengono mantenuti a +4° C fino al momento della loro analisi, che prevede l'estrazione del DNA virale per mezzo del kit DNA IQ SYSTEM.

Il campione viene incubato a 95° C per 30 minuti in un Termocicizzatore; successivamente l'eluente e il tampone vengono trasferiti in una nuova provetta contenente uno Spin Basket e centrifugate a 14000 rpm per 2 minuti. Dopo di che lo Spin Basket viene rimosso e all'eluato recuperato vengono aggiunti 7 µl di resina magnetica, che contiene siti di legame per il DNA virale; la miscela viene sottoposta ad agitazione per mezzo di un vortex e lasciata in incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti. A questo punto la provetta viene posta sul separatore magnetico, istantaneamente la resina, seguendo il campo magnetico generato dal separatore, si posiziona nel centro dello stesso e quindi nella zona più vicina al separatore.

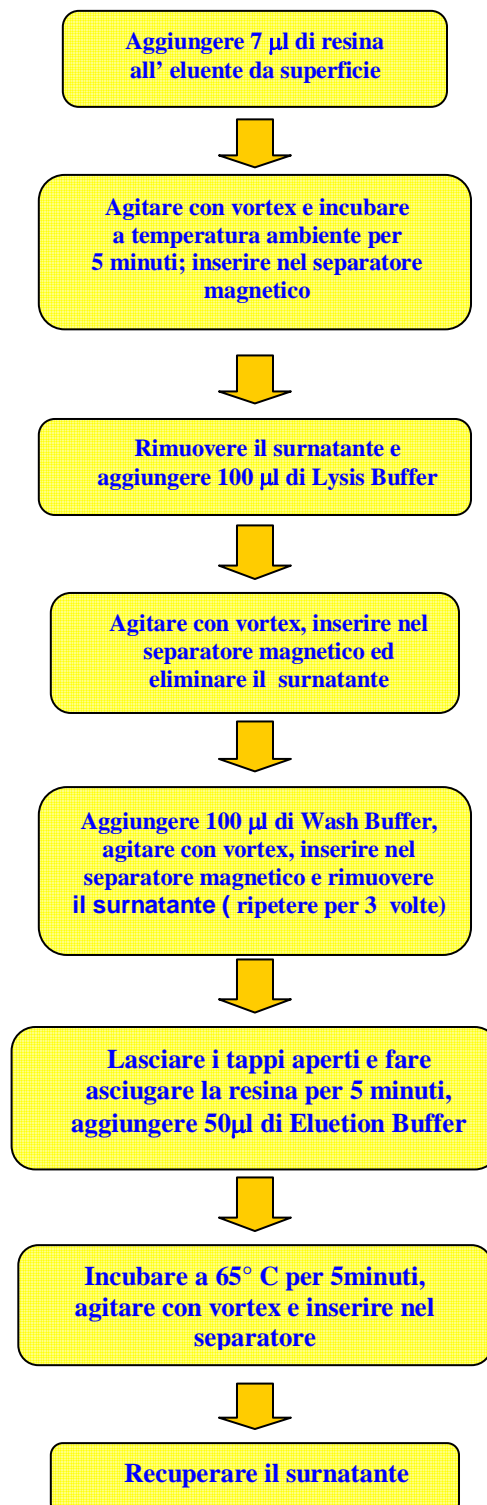
Avviene la rimozione del surnatante e l'aggiunta di 100 µl di Lysis Buffer, l'eppendorf viene agitata con vortex per omogenare la resina all'eluente, posizionata di nuovo sul separatore viene rimosso ancora il surnatante. A questo punto si aggiunge una soluzione di lavaggio costituita da 100 µl di Wash Buffer, con lo scopo di rimuovere residui di tampone per evitare l'inibizione delle successive fasi di amplificazione.

La provetta viene rimossa dal separatore, agitata, rimessa sul separatore ed eliminato il surnatante.

Questa fase viene ripetuta per altre due volte. Rimosso il surnatante dall'ultimo lavaggio, si mantiene a temperatura ambiente l'eppendorf, per 5 minuti in modo tale da fare asciugare la resina; dopo di che si eluisce con 50 µl di Elution Buffer, capace di staccare dalla resina il DNA virale. Per far sì che questo avvenga con successo l'eluente viene incubato con la resina a 65° C per 5 minuti.

Passato il periodo di incubazione le provette vengono agitate con vortex, e viene recuperato il surnatante che rappresenta il DNA estratto, il quale viene conservato a – 80° C fino al momento del suo utilizzo o viene processato direttamente per mezzo di nested-PCR (Verani et al 2004). Il processo è schematizzato nella figura 3.1.1_1 che segue.

Figura 3.1.1_1: Estrazione del DNA con Promega DNA IQ SYSTEM



3.1.2. Ricerca di virus a RNA su superfici

La ricerca di virus a RNA su superfici viene effettuata bagnando i tamponi sterili con estratto di carne al 3% a pH 9 (Carducci et al 2002). Il tampone imbevuto in 1 ml di questo eluente viene strisciato su una superficie di 36 cm², riposto nella propria provetta e mantenuto a +4° C per due ore, durante questo periodo di incubazione le provette vengono agitate con vortex ogni 15minuti. Al termine di questa fase si ha il recupero dell'eluato che viene neutralizzato con HCl 1N. L'estrazione del genoma virale viene effettuata con l'uso di un kit commerciale Qiagen (QIAmp Viral RNA mini kit).

Questo kit permette l'estrazione di RNA virale da campioni di siero, plasma, fluidi biologici privi di cellule e surnatante di colture cellulari.

L'estrazione prevede in primo luogo la preparazione del Buffer AVL che viene miscelato al Carrier RNA (sostanza che facilita l'assorbimento del virus alla membrana della microcolonna), entrambi in quantità pari al numero di campioni che devono essere estratti.

Si aggiungono 560 µl di questa soluzione a 140 µl di eluato, si agita con vortex per 15 secondi e si incuba a temperatura ambiente per 10 minuti, con lo scopo di permettere la lisi delle particelle virali e la inattivazione dell' RNAasi. Vengono, poi, addizionati 560 µl di etanolo al 96% - 100% e, dopo agitazione con vortex per 15 secondi, si prelevano 630 µl di questa miscela e si trasferiscono in una microcolonna sottoposta a una centrifugazione a 6000 xg per 1 minuto. Questa operazione viene ripetuta sui rimanenti 630 µl della miscela dopo aver scartato il filtrato.

Sono stati eseguiti due lavaggi, il primo con 500 µl di Buffer AW1 (centrifugando a 6000 xg per 1 minuto), il secondo con 500 µl di Buffer AW2 centrifugando a 20.000 xg per 4 minuti, in maniera tale da eliminare residui del buffer stesso che avrebbero

potuto creare problemi per le fasi successive. La microcolonna viene trasferita in una nuova eppendorf e l'RNA eluito con 60 µl di Buffer AVE, incubato a temperatura ambiente per 1 minuto e centrifugato a 6000 xg per 1 minuto. A questo punto si ha il recupero dell'eluato e la rimozione della microcolonna.

I volumi estratti dei campioni possono essere utilizzati direttamente per la retrotrascrizione-amplificazione (RT-PCR), per la ricerca di genoma virale, o possono essere conservati a -80° C fino al loro utilizzo.

3.1.3. Ricerca di virus in aerosol

Il campionamento dell'aria effettuato in ambiente sanitario è stato eseguito per mezzo di un campionatore ad impatto Acquaria (Microflow) (Carducci et al 1999) (Figura 3.1.3_1).

Figura 3.1.3_1: Campionatore ad impatto Acquaria



L'apparecchio permette di aspirare una quantità nota di aria, pari, nel nostro caso, a 1000 litri, che prima di essere espulsa dalla parte posteriore va ad impattare la piastra Rodac da 6 cm sulla quale si trova il terreno di coltura.

Il terreno che viene utilizzato per i virus è il TSA (Tryptone Soya Agar), il cui scopo è quello di fornire una superficie su cui il virus possa aderire. L'eluizione del virus dall'agar avviene frammentando il terreno stesso, con un bisturi sterile e trasferendo i frammenti in una provetta da 50 ml in cui vengono aggiunti 15 ml di eluente, estratto di carne al 3% a pH 9.

Si agita su vortex per 10 minuti e si centrifuga a 2800 rpm per 30 minuti, in seguito ai quali avviene il recupero del surnatante che viene neutralizzato con HCl 1N e decontaminato aggiungendo il 10% di cloroformio; si agita a mano per 15 minuti. La successiva centrifugazione a 3500 rpm per 15 minuti permette il deposito del cloroformio sul fondo della provetta e il recupero del surnatante (Figura 3.1.3_2).

I campioni vengono sottoposti a estrazione del DNA o dell'RNA per mezzo di kit commerciali Qiagen (QIAmpViral RNA e QIAmp DNA), già standardizzati in studi precedenti su materiali ambientali (Carducci et al, 2003).

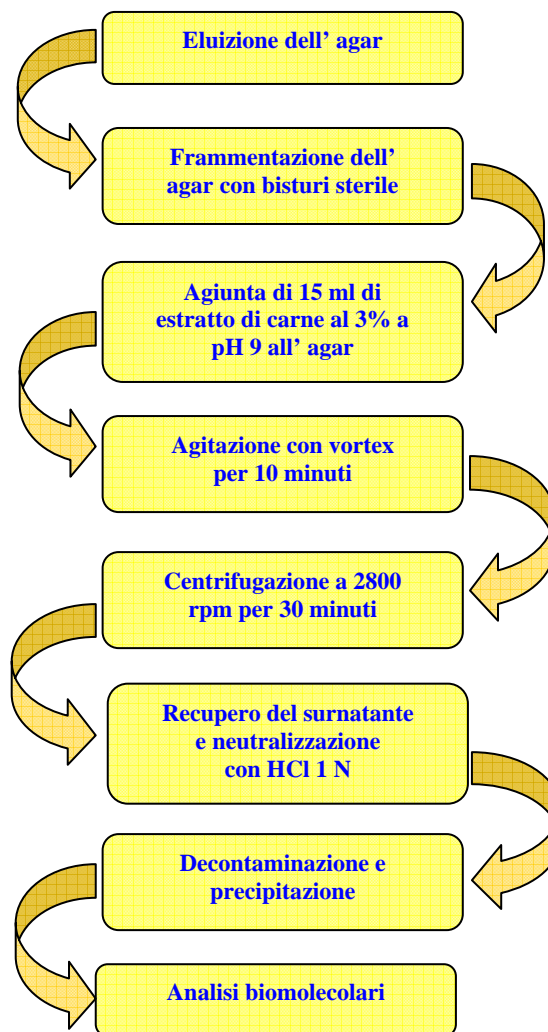
L'estrazione del DNA avviene aggiungendo a 200 µl di campione, 20 µl di Proteinasi K e 200 µl di tampone AL, che permette una lisi efficiente; il tutto è stato agitato con vortex per 15 secondi e incubato a 56° C per 10 minuti.

Nella fase successiva si aggiungono 200 µl di etanolo al 96% - 100%, si agita con vortex per 15 secondi e si trasferisce l'intero volume in una microcolonna, la quale viene sottoposta a centrifugazione a 6000 xg per 1 minuto. Scartato il filtrato si eseguono due lavaggi, il primo con 500 µl di Buffer AW1 (centrifugando a 6000 xg per 1 minuto); il secondo con 500 µl di Buffer AW2 (centrifugando a 20.000 xg per 4 minuti).

Le microcolonne vengono, poi, trasferite in nuove eppendorf ed eluite con 200 µl di Buffer AE, incubato per 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugato a 6000 xg per 1 minuto. Infine viene rimossa la microcolonna e recuperato l'eluato.

I campioni possono essere così sottoposti a reazioni di amplificazione genica attraverso nested – PCR o conservati a – 80° C fino al loro utilizzo.

Figura 3.1.3_2: **Eluizione dei virus dell' agar**



3.1.4. Reazioni di PCR e RT-PCR per la ricerca di TTV, HCV, Adenovirus, Rotavirus e Norovirus gtp I e gtp II.

Le reazioni per la ricerca di TTV, Adenovirus, Rotavirus, Norovirus genotipo I e II ed HCV sono riportate nelle figure da 3.1.4_1 a 3.1.4_6. Per i virus ad RNA è prevista una fase iniziale di retrotrascrizione. La successiva amplificazione prevede l'uso di due set di coppie di primers diversi per aumentare la specificità e la sensibilità della reazione stessa.

Gli amplificati sono stati analizzati mediante separazione elettroforetica in gel di agarosio al 2% colorati con bromuro di etidio, tampone di corsa TBE 1X.

Nella corsa elettroforetica, condotta a 80 Volt per i primi 10 minuti e a 150 Volt per i successivi 30 minuti, insieme ai campioni sono stati fatti correre:

- a) Un marker di frammenti di DNA a pesi molecolari noti (100 bp DNA Ladder), per poter identificare la banda della regione amplificata;
- b) Un controllo negativo per verificare la validità dei risultati.

Al termine della corsa il gel viene letto attraverso il trans-illuminatore con raggi UV.

Figura 3.1.4_1: **PCR nested per Adenovirus** (Allard et al., 1999, Allard et al. 1992, Piug et al. 1994)

1° STEP (301 bp)

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer PCR 10X	50 mM KCl, 0,1% Triton-X-100 10mM Tris-HCl pH8.3, 2µgml ⁻¹ BSA	5 µl
MgCl ₂	1.5 mM KCl	3 µl
DNTPs	1 mM	0.5 µl
Hex1 deg	0.5 µM	0.5 µl
Hex2 deg	0.5 µM	0.5 µl
Taq Polimerasi	2 U	0.4 µl
H ₂ O		30.1 µl
DNA estratto		10 µl

1 ciclo (94° C per 3 min)

35 cicli (94° per 30 sec; 55° C per 30 sec; 72° C per 1 min)

1 ciclo (72° C per 5 min)

2° STEP (171 bp)

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer PCR 10X	50 mM KCl, 0,1% Triton-X-100 10mM Tris-HCl pH8.3, 2µgml ⁻¹ BSA	5 µl
MgCl ₂	1.5 mM KCl	3 µl
DNTPs	1 mM	0.5 µl
Nehex3 deg	0.5 µM	0.5 µl
Nehex4 deg	0.5 µM	0.5 µl
Taq Polimerasi	2 U	0.4 µl
H ₂ O		39.1 µl
DNA amplificato		1 µl

1 ciclo (94° C per 3 min)

35 cicli (94° per 30 sec; 55° C per 30 sec; 72° C per 1 min)

1 ciclo (72° C per 5 min)

Figura 3.1. 4_2 Nested PCR per TTV (Okamoto et al 1999)

1° STEP (143 bp)

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer TAQ*	50 mM KCl, 0,1% Triton-X-100 10mM Tris-HCl pH8.8, 2µgml ⁻¹ BSA	5 µl
MgCl ₂ *	3.5 mM	3,5 µl
Miscela dNTPs diluizione 1:10	0.2 mM	1 µl
Primer NG133	25 pmol	0,5 µl
Primer NG147	25 pmol	0,5 µl
Taq DNA polimerasi*	5U/µl	0,4 µl
H ₂ O		32,5 µl

1 ciclo (95°C per 9 min)**35 cicli (95°C per 30 sec, 60°C per 30 sec, 72°C per 40 sec)****1 ciclo (72°C per 7 min)****2° STEP (110 bp)**

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer TAQ*	50 mM KCl, 0,1% Triton-X-100 10mM Tris-HCl pH8.8, 2µgml ⁻¹ BSA	5 µl
MgCl ₂ *	3.5 mM	3,5 µl
Miscela dNTPs diluizione 1:10	0.2 mM	1 µl
Primer NG134	25 pmol	0,5 µl
Primer NG132	25 pmol	0,5 µl
Taq DNA polimerasi*	5U/µl	0,4 µl
H ₂ O		34,5 µl
DNA estratto		5 µl

1 ciclo (95°C per 9 min)**25 cicli (95°C per 30 sec, 60°C per 30 sec, 72°C per 40 sec)****1 ciclo (72°C per 7 min)**

* Prodotti Promega

Figura 3.1.4_3: **RT-nested PCR per Rotavirus (Gilgen et al . 1997)**

DENATURAZIONE RNA: 94° C per 4 min con 0.5µl di DMSO (5%) + 10 min in ghiaccio

RETROTRASCRIZIONE

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
M-MULV RT Buffer	75 mM KCl, 3mM MgCl ₂ , 50mM Tris-HCl pH 8.3, 10 mM MDDT	4 µl
dNTPs	0.5 mM	Miscela 1:10 → 1 µl
Primer RV 1	50 µM	0.5 µl
Rnase inibitor	10 U	0.33 µl
M-MULV Reverse Transcriptase	100 U	0.5 µl
H ₂ O		3.67 µl
RNA estratto		10 µl

41° C per 60 min

95° C per 5 min

1° STEP (1059 bp)

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer PCR 10X	50 mM KCl, 0,1% Triton-X- 100 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 2µgml ⁻¹ BSA	10 µl
MgCl ₂	1.5 mM	6 µl
DNTPs	0.2 mM	Miscela 1:10 → 2 µl
Primer RV 1	50 µM	0.3 µl
Primer RV 2	50 µM	0.3 µl
Taq Polimerie	2 U	0.4 µl
H ₂ O		61 µl
cDNA		20 µl

1 ciclo (94° C per 1 min)

25 cicli (94° per 30 sec; 55° C per 1 min; 72° C per 1 min)

1 ciclo (72° C per 3 min)

2° STEP (346 bp)

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer PCR 10X	50 mM KCl, 0,1% Triton-X-100 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 2µgml ⁻¹ BSA	10 µl
MgCl ₂	3.5 mM	14 µl
DNTPs	0.2 mM	Miscela 1:10 → 2 µl
Primer RV 1	50 µM	0.5 µl
Primer RV 2	50 µM	0.5 µl
Taq Polimerie	2 U	0.4 µl
H ₂ O		70.6 µl
Prodotto I PCR		2 µl

1 ciclo (94° C per 1 min)

40 cicli (94° per 30 sec; 55° C per 1 min; 72° C per 1 min)

1 ciclo (72° C per 3 min)

Figura 3.1.4_4: **RT-seminested PCR per Norovirus gtp I (Gilgen et al. 1997)****RETROTRASCRIZIONE**

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
RNA estratto		10 µl
MuLV RT*	100 U	0.5 µl
Buffer*	75 mM KCl, 3mM MgCl ₂ , 50mM Tris-HCl pH8.3, 10mMDDT	4 µl
Miscela dNTPs*	0.5 mM diluiti 1:10	1µl
Antisense primer SRI-1	1.25 µM	0.5 µl
Rnasin 10 U*	10 U	0.33 µl
H ₂ O		3,67 µl

41° C per 60 min**95° C per 5 min****1° STEP**

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer 10x*	50 mM KCl, 0,1% Triton-X- 100 10mM Tris-HClpH8.8, 2µgml ⁻¹ BSA	10µl
MgCl ₂ *	3.5 mM	14µl
dNTPs	0.2 mM	Miscela 1:10 → 2 µl
Primer SRI-1	0.25 µM	0,3 µl
Primer SRI-2	0.25 µM	0,3 µl
Taq Polimerase*	2 U	0.4 µl
H ₂ O		53 µl
cDNA		20 µl

1 ciclo (94° C per1 min)**25 cicli (94° C per 30 sec,50° C per 1 min; 72° Cper1 min)****1 ciclo (72° C per 3 min)**

2° STEP (241 bp)

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer 10x*	50 mM KCl, 0,1% Triton-X-100 10mM Tris-HCl pH8.8, 2µgml ⁻¹ BSA	10µl
MgCl ₂ *	1.5 mM	6µl
dNTPs	0.2 mM	Miscela 1:10 → 2 µl
Primer SRI-2	0.5 µM	0,5 µl
Primer SRI-3	0.5 µM	0.5 µl
Taq Polimerase*	2 U	0.4 µl
H ₂ O		78.6 µl
Prodotto I PCR		2 µl

1 ciclo (94° C per 1 min)

40 cicli (94° C per 30 sec, 50° C per 1 min; 72° C per 1 min)

1 ciclo (72° C per 3 min)

* Prodotti Promega

Figura 3.1.4_5: **RT-seminested PCR per Norovirus gtp II (Gilgen et al. 1997)**

RETROTRASCRIZIONE

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
RNA estratto		10 µl
MuLV RT*	100 U	0.5 µl
Buffer*	75 mM KCl, 3mM MgCl ₂ , 50mM Tris-HCl pH8.3, 10mMDDT	4 µl
Miscela dNTPs*	0.5 mM diluiti 1:10	1µl
Antisense primer SRII-1	1.25 µM	0.5 µl
Rnasin 10 U*	10 U	0.33 µl
H ₂ O		3,67 µl

41° C per 60 min

95° C per 5 min

1° STEP

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer 10x*	50 mM KCl, 0,1% Triton-X-100 10mM Tris-HCl pH8.8, 2µgml ⁻¹ BSA	10µl
MgCl ₂ *	3.5 mM	14µl
dNTPs	0.2 mM	Miscela 1:10 → 2 µl
Primer SRII-1	0.25 µM	0,3 µl
Primer SRII-2	0.25 µM	0,3 µl
Taq Polimerase*	2 U	0.4 µl
H ₂ O		53 µl
cDNA		20 µl

1 ciclo (94° C per 1 min)

25 cicli (94° C per 30 sec, 55° C per 1 min; 72° C per 1 min)

1 ciclo (72° C per 3 min)

2° STEP (203bp)

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer 10x*	50 mM KCl, 0,1% Triton-X-100 10mM Tris-HCl pH8.8, 2µgml ⁻¹ BSA	10 µl
MgCl ₂ *	1.5 mM	6 µl
dNTPs	0.2 mM	Miscela 1:10 → 2 µl
Primer SRII-2	0.5 µM	0,5 µl
Primer SRII-3	0.5 µM	0.5 µl
Taq Polimerase*	2 U	0.4 µl
H ₂ O		78.6 µl
Prodotto I PCR		2 µl

1 ciclo (94° C per 1 min)

40 cicli (94° C per 30 sec, 50° C per 1 min; 72° C per 1 min)

1 ciclo (72° C per 3 min)

* Prodotti Promega

Figura 3.1.4_6: **RT-nested PCR per HCV** (Garson et al. 1990; Piazza et al. 1995, modificato)

RETROTRASCRIZIONE

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer 5x*	75 mM KCl, 3mM MgCl ₂ , 50mM Tris-HCl pH8.3, 10mMDDT	6 µl
DNTPs	0.2 mM	Miscela 1:100 → 6 µl
HCV 1	50 pmol/µl	1 µl
M-MLV*	10 U/µl	1:5 → 2 µl
RNAasin*		1,3 µl
RNA		13,7 µl

42° C per 60 min

95° C per 5 min

1° STEP (289 bp)

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer 10x*	50 mM KCl, 0,1% Triton-X- 100 10mM Tris-HClpH8.8, 2µgml ⁻¹ BSA	10 µl
MgCl ₂ *	1.5 mM	10 µl
DNTPs	0.2 mM	Miscela 1:10 → 4 µl
HCV 2	50 pmol/µl	1 µl
Taq Polimerase*	3,5 U	0,7 µl
H ₂ O		46,3 µl
cDNA		5 µl

1 ciclo (94° C per 5 min)

35 cicli (94° C per 30 sec; 45° C per 1 min; 72° C per 1min e 30 sec)

1 ciclo (72° C per 7 min)

2° STEP (187 bp)

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer 10x*	50 mM KCl, 0,1% Triton-X-100 10mM Tris-HCl pH8.8, 2µgml ⁻¹ BSA	10 µl
MgCl ₂ *	1.5 mM	8 µl
dNTPs	0.2 mM	Miscela 1:10 → 4 µl
HCV 3	50 pmol/µl	1 µl
HCV 4	50 pmol/µl	1 µl
Taq Polimerase*	3,5 U	0,6 µl
H ₂ O		70,4 µl
Prodotto I PCR		5 µl

1 ciclo (94° C per 5 min)**25 cicli (94° C per 30 sec; 45° C per 1 min; 72° C per 1min e 30 sec)****1 ciclo (72° C per 7 min)**

* Prodotti Promega

I primers utilizzati per ognuna di queste amplificazioni sono già stati standardizzati su lavori precedentemente svolti su campioni ambientali, permettono l'amplificazione della regione conservata di ogni specie virale (Tabella 3.1.4_1).

Tabella 3.1.4_1 : **Primers e regioni genomiche virali amplificate**

VIRUS E OLIGONUCLEOTIDE	REGIONE	SEQUENZE 5'-3'
TTV NG 133 NG 147 NG 132 NG 134	UTR (A)	GTAAGTGCACTTCCGAATGGCTGAG GCCAGTCCCGAGCCCGAATTGCC AGCCCGAAT TGCCCCTTGAC AGCTTTCCACGCCCGTCCGCACG
Adenovirus Hex1deg Hex2 deg Nehex3deg Nehex4deg	E1-A/B	GCCSCARTGGKWCWTACATGCACATC CAGCACSCCICGRATGTCAAA GCCCGYGCMAICIGAIACSTACTTC CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA
Norovirus gtp I SRI- 1 SRI- 2 SRI- 3	Capside	CCAACCCARCCATTRTACAT AAATGATGATGGCGTCTA AAAAYRTCACCGGGKGTAT
Norovirus gtp II SRII- 1 SRII-2 SRII- 3	RNA pol.	CGCCATCTTCATTACAAAA TWCTCYTTYTATGGTGATGATGA TTWCCAAACCAACCGWCTG
Rotavirus RV 1 RV 2 RV 3 RV 4	Gene VP7	GTCACATCATACAATTCTAATCTAAG CTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTG TGTATGGTATTGAATATACCAC ACTGATCCTGTTGGCCAWCC
HCV HCV 1 HCV 2 HCV 3 HCV 4	5' NCR	GATGCACGGTCTACGAGACCTC AACTACTGTCTTCACAGCCAGAA GCGACCCAACACTACTCGGCT ATGGCGTTAGTATGAGTG

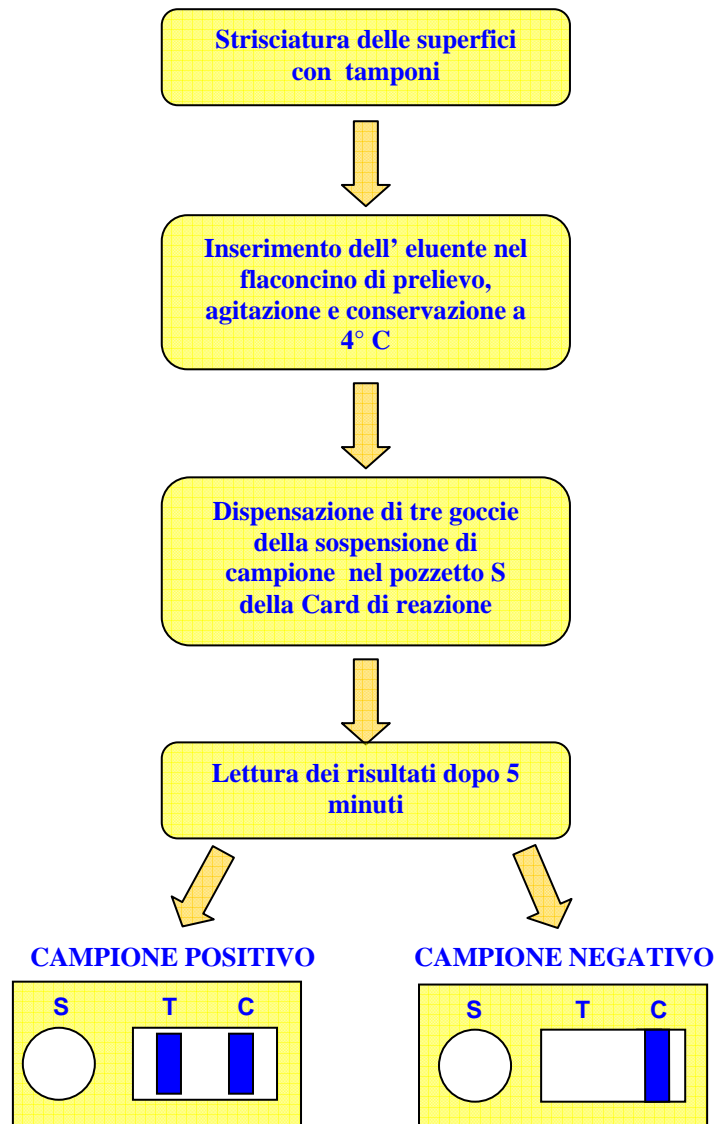
3.1.5. Ricerca dell'emoglobina su superfici

Per la ricerca dell'emoglobina su superfici solide non si hanno, ad oggi, metodiche standardizzate, per cui si fa uso di un kit che rileva la presenza della stessa nel sangue occulto nelle feci (OC-HEMOcard- Alfabiotech®-Wassermann).

La tecnica si basa sulla filtrazione del campione, opportunamente diluito, attraverso una membrana contenente particelle oro-colloidalì rivestite di anticorì IgG di topo monoclonali coniugati con un colorante. L' immunocomplesso che si forma migra verso la zona di rilevazione dove è stato legato ad altri anticorpi monoclonali anti-emoglobina. La presenza di emoglobina viene rilevata da due linee colorate, mentre la presenza di una sola linea indica la negatività del test.

La lettura dei risultati si effettua dopo 5 minuti (Figura 3.1.5_1). Per poter applicare questo test alle superfici, il tampone di diluizione del flaconcino di prelievo è stato utilizzato per bagnare il tampone con cui strisciare la superficie. Infine il tampone viene di nuovo immerso nella soluzione che è stata agitata con vortex per 10 minuti e trasferita, nuovamente, nel flaconcino di prelievo per la filtrazione (Carducci et al. 2002).

Figura 3.1.5_1: Ricerca dell'emoglobina su superfici



Legenda: S = pozzetto di raccolta del campione
T = presenza di emoglobina
C = controllo positivo

3.1.6. Ricerca della Carica Batterica Totale su superfici e in aerosol

La determinazione della carica batterica totale su superfici è stata effettuata attraverso l'apposizione di piastre contenenti un terreno specifico, il PCA (Plate Count Agar), sul piano sottoposto a campionatura. Le piastre sono state incubate a 37° C per 48 ore, successivamente alle quali si è proceduto alla conta delle colonie per la determinazione della carica batterica; la cui classificazione è stata eseguita secondo i livelli di giudizio fissati dalla American Public Health Association (1970) ed espressa in UFC/cm².

Per quello che concerne la ricerca della carica batterica in aerosol, sono stati aspirati 500 litri di aria per mezzo di un campionatore per impatto AirIdeal (BioMérieux) su piastre contenenti TSA (Tryptone Soya Agar) e sono state incubate a 37° C per 48 ore. La classificazione della carica batterica, in questo caso, è stata effettuata seguendo i livelli di giudizio dell'OMS per gli ambienti ospedalieri (Camellini, 2002).

3.1.6.1. Ricerca di Stafilococchi, Miceti e Pseudomonas su superfici

La determinazione di Stafilococchi, Miceti e Pseudomonas è stata eseguita attraverso l'apposizione di piastre, su superfici, contenenti terreni specifici per i diversi microrganismi: SAB (Sabouraud-Dextrose Agar) per i miceti , MSA (Mannitol Salt Agar) per gli Stafilococchi, e CTA (Cetrimide Tryptone Agar) per Pseudomonas; vengono incubate a 37° C per 48 ore, successivamente alle quali si è effettuata la conta delle colonie espresse in UFC/cm².

3.1.6.2. Ricerca di Stafilococchi, Miceti, Pseudomonas e Enterococchi in aerosol

Sono stati aspirati 500 litri di aria attraverso un campionatore per impatto AirIdeal (BioMérieux) cambiando alternativamente le piastre contenenti i terreni specifici per i diversi microrganismi, per gli Stafilococchi, Pseudomonas e i miceti sono stati utilizzati i terreni impiegati per la loro ricerca sulle superfici. Nell'aerosol oltre a questi microrganismi si ricercano gli enterobatteri, il cui terreno specifico è l'MCA (McConkey Agar). Le piastre vengono incubate a 37° C per 48 ore. La conta delle colonie è stata espressa in UFC/m³.

3.2. Monitoraggio delle matrici ambientali

La ricerca di TTvirus, come possibile indicatore di contaminazione virale in ambiente ospedaliero, è stata ampliata a diverse matrici che comprendono acque adibite a diversi usi. La cui analisi si è svolta, attraverso l'uso di tecniche biomolecolari, in concomitanza alla ricerca di virus ad elevata sopravvivenza ambientale (Adenovirus, Rotavirus, Norovirus), a virus patogeni (HAV e Enterovirus), ad indicatori di contaminazione biologica (*E. Coli* ed Enterococchi) e ad indicatori di contaminazione virale (Colifagi Somatici).

I corpi idrici presi in considerazione per queste analisi sono (Figura 3.2_1):

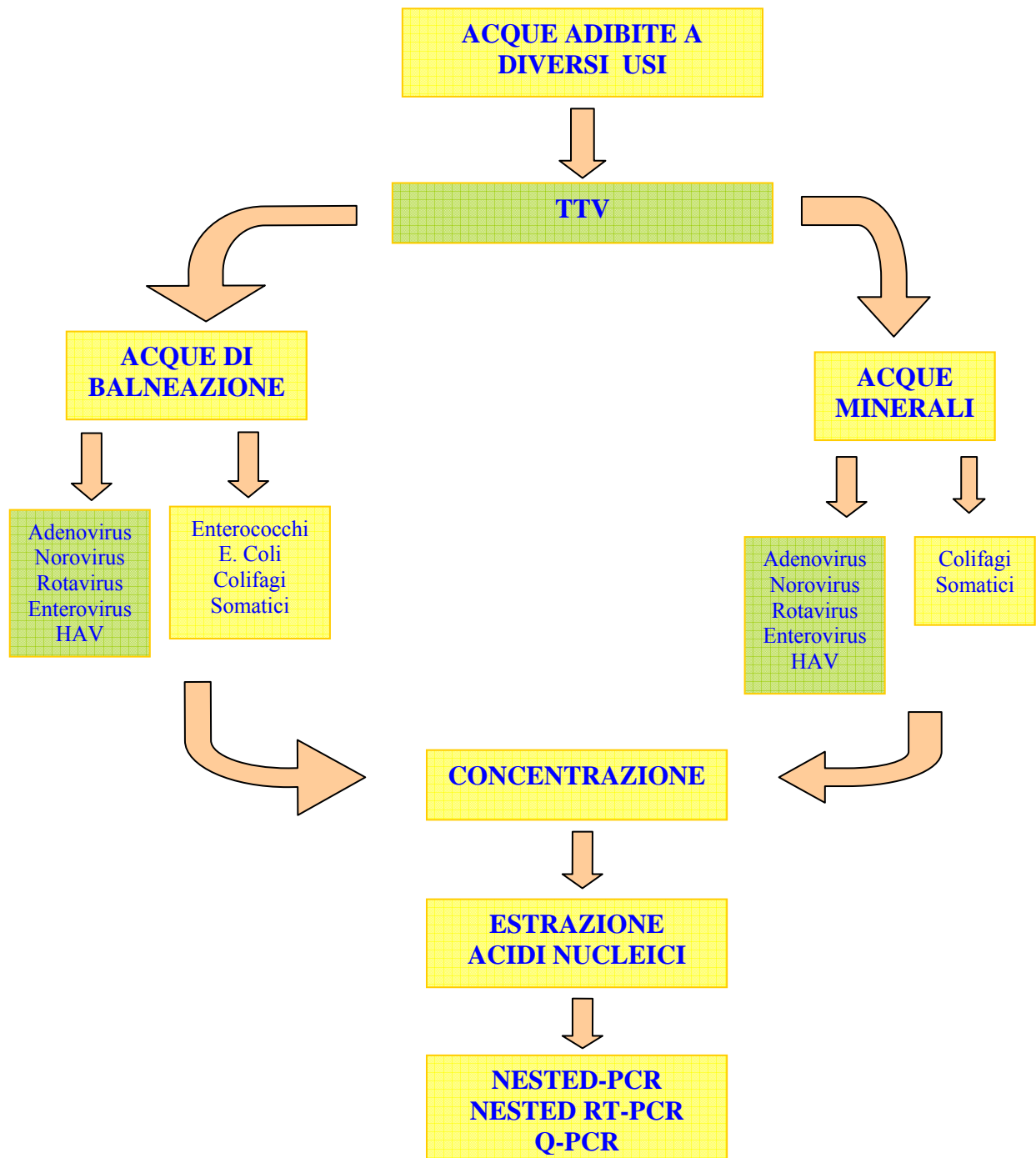
- Acque di balneazione: il cui campionamento è stato effettuato nella stagione Balneare 2006, da Giugno a Ottobre, presso due punti di prelievo localizzati sulla costa litoranea pisana, all'interno del Parco Naturale di Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli. Sono stati effettuati 24 prelievi di 10 litri ciascuno per le analisi virologiche, utilizzando recipienti di polietilene precedentemente sanitizzati con ipoclorito allo 0,1 % e neutralizzati con tiosolfato allo 0,2 %. Per la determinazione batteriologica e fagica sono stati prelevati 50 ml di acqua marina per mezzo di bottiglie di vetro sterili.

L'80% dei campioni è stato prelevato a livello della spiaggia attigua alla foce del fiume Morto, per le sue caratteristiche di corpo idrico ricevente le acque trattate dal depuratore San Jacopo, al quale sono convogliati gli scarichi della parte Nord di Pisa. Il restante 20% è stato prelevato a livello della spiaggia situata nelle vicinanze della foce del fiume Arno.

- Acque Minerali: il cui campionamento è stato effettuato da enti esterni in quattro diversi periodi, Maggio, Giugno, Settembre e Ottobre 2006. Ci

sono pervenuti, in contenitori di polietilene, 100 litri di campione derivante dalle diverse sorgenti e 100 litri di campione imbottigliato, per un totale di 25 campioni, che sono stati sottoposti ad analisi virologiche e fagiche.

Figura 3.2_1: Monitoraggio delle matrici ambientali



3.2.1. Analisi dei corpi idrici

L'analisi virologica dei campioni è stata eseguita attraverso due fasi, la prima comprende una pre-filtrazione, necessaria per eliminare i residui più grossolani, la seconda si basa sulla filtrazione a flusso tangenziale a due stadi (Carducci et al. 1994).

3.2.1.1. Pre-filtrazione

Il campione viene filtrato, con l'utilizzo di una pompa a vuoto, attraverso una membrana in polipropilene con porosità pari a 10 µm, in modo tale da eliminare la parte più grossolana.

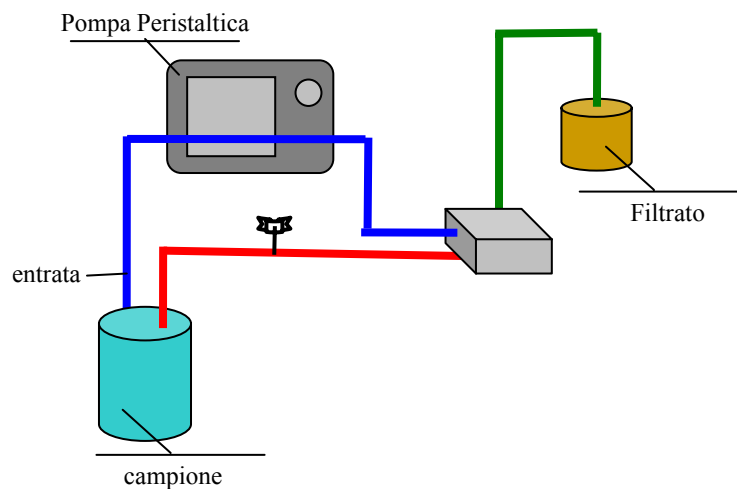
La membrana, in seguito alla filtrazione, viene eluita con 20 ml di estratto di carne al 3% a pH 9; agitata a mano per 10 minuti e centrifugata a 3500 rpm per 15 minuti, per poter recuperare le particelle virali che possono rimanere adese al prefiltro.

Il surnatante viene recuperato e cumulato al campione prefiltrato che viene così sottoposto alla filtrazione a flusso tangenziale.

3.2.1.2. Concentrazione a flusso tangenziale

La tecnica dell'ultra-filtrazione o filtrazione a flusso tangenziale, prevede l'utilizzo di una pompa peristaltica (apparato Mini-ultrasette -Omega OC- Pall) dotata di una membrana in polisulfone con taglio molecolare di 10 KD (Figura 3.2.1.2_1.).

Figura 3.2.1.2_1: **Schema dell' apparato di ultrafiltrazione a flusso tangenziale**



L'impiego di queste membrane è dovuto alla loro elevata capacità di recuperare virus, soprattutto enterovirus (Carducci et al. 1994), e i batteriofagi (Donia et al., 1998, Grabow., 2001).

La tecnica dell'ultrafiltrazione avviene attraverso due stadi successivi che differiscono per il volume iniziale di campione, che deve essere concentrato e per la quantità dei soluti, che nella seconda fase sono la metà dei volumi della prima.

Inizialmente si effettua il condizionamento della membrana facendo passare 2 litri di acqua deionizzata a perdere (1 litro nella seconda fase), per eliminare la soluzione di mantenimento della membrana stessa. La quale viene caricata con 300 ml di estratto di carne al 3% a pH 7 (100 ml per la riconcentrazione) a ricircolo per 10 minuti, in modo tale da saturare i siti attivi ed evitare l'adsorbimento dei virus.

Si procede, quindi, con la concentrazione del campione (10 litri o 100 litri) a ricircolo, ad una pressione costante di circa 1 bar, in maniera da ottenere un volume di concentrato pari a 500 ml nella prima fase e 50 ml nella seconda fase.

Al termine della concentrazione la membrana, sulla quale possono essersi adsorbite particelle virali, viene eluita con 200 ml (20 ml per il secondo stadio) di estratto di carne al 3% a pH 9 per 10 minuti a ricircolo e successivo cumulo dell' eluato al concentrato.

Il campione concentrato viene neutralizzato con HCl 1 N e conservato a - 80° C (Mendez et al., 2002) fino alla sua analisi.

La membrana viene a questo punto sanitizzata facendo passare 1 litro di soluzione di ipoclorito di sodio all'1 % a perdere (500 ml per la seconda fase); la stessa soluzione viene poi fatta passare per altre due volte a ricircolo per 15 minuti. Per eliminare l'ipoclorito si passano a perdere 2 litri di acqua deionizzata (1 litro per la fase di riconcentrazione), la membrana viene, poi, mantenuta con una soluzione di NaOH 0.05 N in 500 ml (250 ml) che viene fatta passare per 4 minuti.

3.2.1.3. Trattamento al cloroformio

Prima di procedere alla determinazione dei principali virus enterici i campioni concentrati devono essere sottoposti a trattamento al cloroformio per abbattere la componente batterica. La quantità di cloroformio che viene aggiunta è in rapporto 1:10, si agita manualmente per 15 minuti e si centrifuga a 3500 rpm per 15 minuti, al termine dei quali viene recuperato il surnatante e conservato a -20° C.

3.2.2. Estrazione degli Acidi Nucleici e Ricerca del Genoma Virale.

L' estrazione degli acidi nucleici viene effettuata attraverso l'uso di kit QIAGEN (QIAmp Viral RNA mini kit e QIAmp DNA mini kit), che sono stati utilizzati, anche, per la ricerca di genoma virale in ambiente ospedaliero.

I protocolli per la determinazione di TTV, Adenovirus, Norovirus gtp I e gtp II e Rotavirus sono gli stessi che sono stati impiegati nel monitoraggio ospedaliero, ai quali dobbiamo aggiungere la ricerca degli Enterovirus, dell' HAV e del Virus dell'Influenza A, per il quale abbiamo utilizzato la Real - Time PCR (Figure da 3.2.2_1 a 3.2.2_3).

Figura 3.2.2_1: **RT-seminested PCR per Enterovirus** (Gilgen et al.,1997)

RETROTRASCRIZIONE

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
RNA estratto		10 µl
Buffer*	75 mM KCl, 3mM MgCl ₂ , 50mM Tris-HCl pH 8.3, 10mMDDT	4 µl
dNTPs*	0.5 mM	Miscela 1:10→ 1 µl
Primer EV03	1.25 mM	0.5 µl
Rnase inhibitor*	10 U	0.33 µl
M-MuLV Reverse Transcriptase*	100 U	0.5 µl
H ₂ O		3,67 µl

41° C per 60 min

95° C per 5 min

1° STEP

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer 10x*	75 mM KCl, 3mM MgCl ₂ , 50mM Tris-HCl pH 8.3, 10mMDDT	10µl
MgCl ₂ *	3.5 mM	14µl
dNTPs	0.2 mM	Miscela 1:10 → 2 µl
Primer EV03	0.25 µM	0,3 µl
Primer EV06	0.25 µM	0,3 µl
Taq Polimerase*	2 U	0.4 µl
H ₂ O		53 µl
cDNA		20 µl

1 ciclo (94° C per1 min)

25 cicli (94° C per 30 sec,55° C per 60 sec; 72° C per 60 sec)

1 ciclo (72° C per 3 min)

2° STEP (400 bp)

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer 10x*	75 mM KCl, 3mM MgCl ₂ , 50mM Tris-HCl pH 8.3, 10mMDDT	10 µl
MgCl ₂ *	3 mM	12 µl
dNTPs	0.2 mM	Miscela 1:10 → 2 µl
Primer EV03	0.5 µM	0,5 µl
Primer EV05	0.5 µM	0.5 µl
Taq Polimerase*	2 U	0.4 µl
H ₂ O		72.6 µl
Prodotto I PCR		2 µl

1 ciclo (94° C per1 min)

40cicli (94° C per 30 sec,55° C per 60 sec; 72° C per 60 sec)

1 ciclo (72° C per 10 min)

* Prodotti Promega

Figura 3.2.2_2: RT- nested PCR per HAV (Divizia et al., 1997)

RETROTRASCRIZIONE

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
RNA estratto		13.7 µl
Buffer*	75 mM KCl, 3mM MgCl ₂ , 50mM Tris-HCl pH 8.3, 10mMDDT	6 µl
dNTPs*	0.2 mM	Miscela 1:100→ 6 µl
Primer E-(HAV 2)	50 pmol/µl	1 µl
Rnase inhibitor*	40 U	1.3 µl
M-MuLV Reverse Transcriptase*	4 U	Miscela 1:5→ 2µl
H ₂ O		3,67 µl

95° C per 5 min**4° C per 5 min****42° C per 1 ora****95° C per 5 min****1° STEP**

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer 10x*	75 mM KCl, 3mM MgCl ₂ , 50mM Tris-HCl pH 8.3, 10mMDDT	10µl
MgCl ₂ *	2.5 mM	10µl
dNTPs	0.2 mM	Miscela 1:100 → 20 µl
Primer E+ (HAV 1)	50 pmol/µl	1 µl
Taq Polimerase*	2 U	0.4 µl
H ₂ O		48.6 µl
cDNA		10 µl

1 ciclo (94° C per 2 min)**30 cicli (94° C per 1 min, 45° C per 1 min; 72° C per 2 min)****1 ciclo (72° C per 7 min)**

2° STEP (234 bp)

REAGENTI	CONCENTRAZIONE	VOLUME
Buffer 10x*	75 mM KCl, 3mM MgCl ₂ , 50mM Tris-HCl pH 8.3, 10mMDDT	10 µl
MgCl ₂ *	2.5 mM	10 µl
dNTPs	0.25 mM	Miscela 1:100 → 25 µl
Primer I+ (HAV3)	50 pmol/µl	1 µl
Primer I- (HAV 4)	50 pmol/µl	1 µl
Taq Polimerase*	2 U	0.4 µl
H ₂ O		47.6 µl
Prodotto I PCR		5 µl

1 ciclo (94° C per 2 min)**30cicli (94° C per 1 min,45° C per 1 min; 72° C per 2 min)****1 ciclo (72° C per 15 min)**

* Prodotti Promega

I primers utilizzati per queste reazioni permettono l'amplificazione della regione conservata di ogni specie virale (Tabella 3.2.2_1).

Tabella 3.2.2_1: **Primers e regioni genomiche virali amplificate**

VIRUS E OLIGONUCLEOTIDE	REGIONE	SEQUENZE 5'-3'
Enterovirus EV03 EV06 EV05	UTR	ATTGTCACCATAAGCAGCCA CACGGACACCCAAAGTA CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG
HAV HAV1 HAV2 HAV3 HAV4	2A e 2B	ATGCTTGGATTGTCTGGAGT GAACAAATATCTCTTAACCA ATGATGTTTGGATTTTCATCAT CTGGAGTCCATTGCCAAATT

3.3. Ricerca dei Colifagi Somatici

La determinazione dei colifagi somatici è stata effettuata secondo la norma ISO/DIS 10705-2.

Sono state preparate aliquote da 2,5 ml di ssMSA (semisolid Modified Scholtens' Agar) con CaCl_2 , per favorire l'attacco dei fagi sui batteri, e mantenute in stato liquido a bagnomaria alla temperatura di circa 45°C.

Ad ogni aliquota vengono aggiunti:

- 1 ml di coltura di *E. Coli* (ATTC 13706) in fase esponenziale di crescita, preparata facendo crescere i batteri su MSB (Modifeid Scholtens' Broth) a 37°C per circa 3 ore, dopo le quali attraverso la misurazione dell'assorbanza, (0.35 a 640 nm o 520 nm) con spettro-fotometro, si valuta l'avvenuta crescita, che deve essere intorno a 10^8 CFU/100 ml.
- 1 ml del campione idrico e diverse diluizioni dello stesso in duplicato (in base al tipo di campione: 1:10 per le acque di mare, $1:10^2$ - $1:10^3$ per l'acque di fiume e i liquami in uscita dal depuratore, $1:10^2$ - $1:10^3$, $1:10^4$ per il liquame in entrata e l'intero per le acque minerali).

Per ogni campione sono stati effettuati due controlli negativi, costituiti da MSB, al posto del campione e dalla soluzione utilizzata per le diluizioni; e un controllo positivo dato dalla diluizione decimale del batteriofago Φ X174 (ATCC B1-13706).

La miscela che si è ottenuta viene mescolata e seminata su due piastre Petri, di 9 cm di diametro, sulle quali sono stati precedentemente versati 20 ml di terreno di

crescita, costituito da MSA (Modifeid Scholtens' Agar). Le piastre vengono fatte asciugare ed incubate a 37° C per 18±2 ore.

La lettura è stata eseguita leggendo il numero di placche di lisi presenti sul terreno, considerando il fattore di diluizione e la concentrazione del campione. I risultati vengono espressi in UFP/100 ml (Figura 3.3_1).

Figura 3.3_1: **Placche di lisi da batteriofagi**



3.3.1. Ricerca degli Indicatori Batterici

La ricerca di *E. coli* e di Enterococchi intestinali è stata effettuata su tutti i campioni di acque di balneazione con l'uso di metodi ISO 9308-3 (per *E. coli*) e ISO 7899-1 (per Enterococchi).

Queste norme prevedono l'inoculo del campione, nelle diluizioni prestabilite dalla normativa stessa (vedi tabella 3.5.1.a), in una serie di pozzetti su micropiastre (sistema miniaturizzato) contenenti il terreno di coltura disidratato.

La lettura delle piastre viene effettuata con una lampada di Wood (UV di 366 nm) al buio, dopo un periodo di incubazione che può andare da un minimo di 36 ore ad un massimo di 72 ore, a 44° C.

La presenza di *E. coli* viene messa in evidenza dalla fluorescenza blu risultante dall'idrolisi del 4-methyl-umbellifery-β-D-glucuronide (MUG), substrato disidratato del pozzetto; mentre la determinazione degli enterococchi intestinali, è sempre data

dalla fluorescenza blu, ma il substrato disidratato è il 4-methyl-umbrellireryl- β -D-glucoside (MUD). I risultati vengono elaborati attraverso la conta dei pozzetti positivi nelle diverse diluizioni, secondo il metodo degli MPN (Most Probable Number).

Tabella 3.3.1_1: **Scelta delle diluizioni**

ORIGINE DEL CAMPIONE	NUMERO DI DILUIZIONI	NUMERO DI POZZETTI/ DILUIZIONE	LIMITE DI MISURA Batteri/100 ml
Acque di balneazione	2	64 pozzetti 1/ 2 32 pozzetti 1/ 20	15 to 3.5 x 10 ⁴
Acque dolci di superficie	4	24 pozzetti 1/ 2 24 pozzetti 1/ 20 24 pozzetti 1/ 200 24 pozzetti 1/ 2000	40 to 3.2 x 10 ⁶
Acque residuali e di depurazione	6	16 pozzetti 1/ 2 fino 16 pozzetti 1/ 200000	60 to 6.7 x 10 ⁸

3.4. Prove di resistenza del genoma virale alla disinfezione su superfici

Il possibile impiego di TTV come indicatore di contaminazione delle matrici ambientali, ma soprattutto nosocomiali, ha portato all'allestimento di test di recupero per verificare la presenza del virus stesso, ma soprattutto la sua capacità infettante, in ambito ospedaliero, in concomitanza alla ricerca di Adenovirus.

Queste prove si basano sulla contaminazione artificiale di superfici, sulla loro disinfezione con prodotti commerciali a diverse diluizioni e il recupero, a tempi differenti, per mezzo di tamponi sterili imbevuti con estratto di carne al 3 % a pH 9.

Alcune prove sono state effettuate senza l'uso del disinfettante.

L'allestimento di entrambi i test prevede l'uso di 2 piastre in acciaio inox, sterili, che vengono posizionate sotto cappa biologica e divise in 6 quadranti ciascuna; in ognuno dei quali si distribuiscono 10 µl di siero positivo a titolo noto per TTV (1.4×10^5 copie/ml) e per Adenovirus (genotipo 10^8 copie/ml) (Figura 3.4_1).

Figura 3.4_1: **Preparazione delle prove di resistenza**

2 minuti 10 µl 1.4×10^5 copie TTV 10^8 copie Adenovirus	5 minuti 10 µl 1.4×10^5 copie TTV 10^8 copie Adenovirus	10 minuti 10 µl 1.4×10^5 copie TTV 10^8 copie Adenovirus
20 minuti 10 µl 1.4×10^5 copie TTV 10^8 copie Adenovirus	30 minuti 10 µl 1.4×10^5 copie TTV 10^8 copie Adenovirus	Controllo Positivo 10 µl 1.4×10^5 copie TTV 10^8 copie Adenovirus

Il siero viene fatto asciugare e, nella analisi senza l'impiego del disinfettante abbiamo la diretta eluizione, con tamponi sterili in cellulosa bagnati con estratto di carne al 3% a pH 9, a diversi tempi di contatto (2 min, 5 min, 10 min, 20 min e 30 min); mentre le prove effettuate con disinfettante a diluizioni diverse ($1:10^{-4}$ e $1:10^{-5}$), prevedono la distribuzione di circa 150 μ l dello stesso in 5 dei 6 quadranti, in quanto uno di questi viene utilizzato come controllo positivo, quindi eluito direttamente.

Il disinfettante viene lasciato ad essiccare per circa 10 minuti, successivamente ai quali si ha l'eluizione con estratto di carne al 3% a pH 9, per mezzo di tamponi sterili, a tempi di contatto diversi (2 min, 5 min, 10 min, 20 min e 30 min).

La fase successiva prevede l'incubazione dei tamponi a 4° C per circa 2 ore, durante le quali i campioni vengono agitati con vortex ad intervalli di tempo di 15 minuti; si procede, poi, al recupero dell'eluato che viene neutralizzato con HCl 1 N (Figure 3.4_2 e 3.4_3).

Il campione viene conservato a -80° C oppure si esegue l'estrazione del DNA per mezzo di kit QIAGEN (QIAmp DNA mini kit).

Figura 3.4_2: **Protocollo di recupero di TTV e Adenovirus su superfici senza disinfettante**

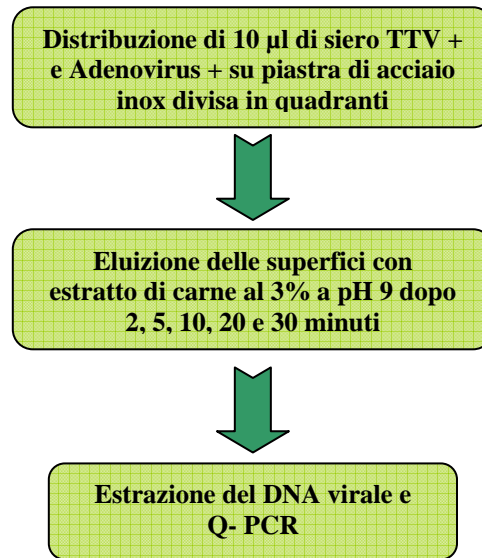
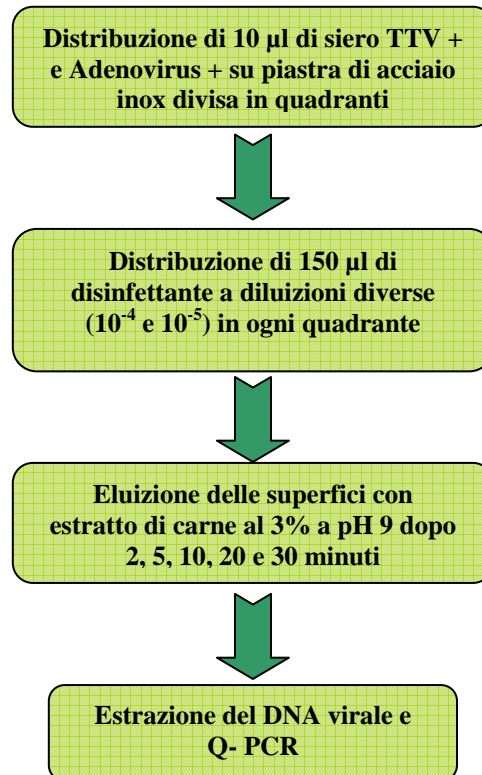


Figura 3.4_3: **Protocollo di recupero di TTV e Adenovirus su superfici con disinfettante**



3.4.1 Reazione di quantificazione del genoma di TTvirus e Adenovirus con Real- Time PCR

La Real - Time PCR ha la capacità di monitorare il progresso della PCR, basandosi sulla quantificazione e l'amplificazione del DNA o dell' RNA. Le reazioni sono caratterizzate da una serie di cicli durante i quali si valuta la quantità di target presente, che viene messa in evidenza attraverso un incremento sigmoide della fluorescenza.

Questa analisi viene effettuata con un apparecchiatura della Applied Biosystems, il Sequence Detection System 7300 (SDS), che utilizza coloranti fluorescenti che intercalano il DNA a doppio e gli oligonucleotidi modificati del DNA (sonde) che assumono fluorescenza in seguito alla ibridazione con un DNA.

Abbiamo utilizzato per questa tecnica la TaqMan, che fa uso di una specifica sonda di idrolisi alla cui estremità 5' presenta il fluorocromo reporter (6-carbossi-fluoresceina, FAM) ed all'estremità 3' una molecola quencher (6-carbossi-tetrametil-rodamina, TAMRA).

Fino a che la sonda rimane intatta, così come l'abbiamo appena descritta, l'emissione della fluorescenza da parte del reporter è ridotta, dal fenomeno di trasferimento energetico (FRET).

La presenza della sequenza target permette alla sonda di legarsi a valle a livello di uno dei siti del primer, dove viene separata dall'attività esonucleasica della Taq DNA polimerasi durante l'estensione del primer stesso.

La rottura della sonda separa il colorante del reporter da quello del quencher, determinando un incremento del segnale del reporter stesso; inoltre la rimozione della sonda dal target, permette l'estensione dei primers fino alla fine del filamento, in modo tale da evitare l'inibizione del processo di PCR da parte della sonda stessa. Le molecole

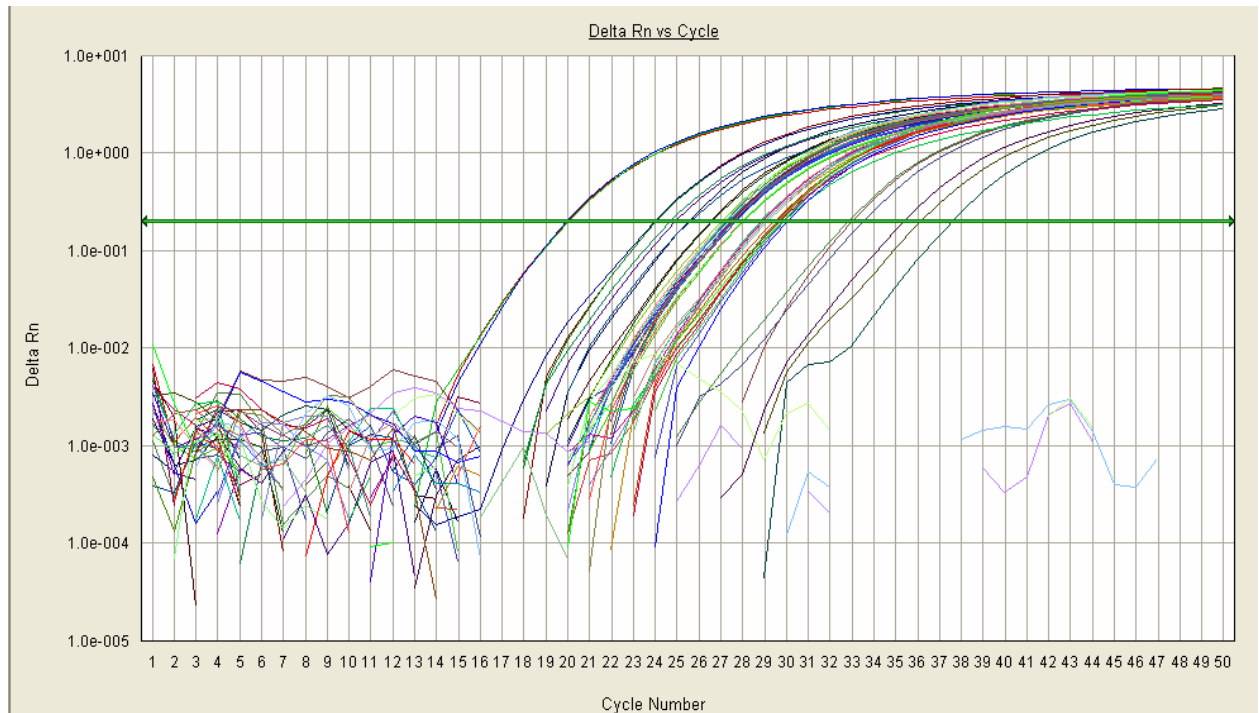
colorate del reporter vengono separate dalla sonda dopo pochi cicli di applicazione. Risulta, quindi, un' incremento nell'intensità della fluorescenza proporzionale all'aumento del prodotto amplificato.

La quantità della emissione di fluorescenza dipende dal numero di cicli di PCR, ed è proporzionale alla quantità di DNA target presente nel campione che stiamo analizzando.

La specificità della sonda è tale da escludere la presenza di falsi positivi, in quanto la quantificazione viene effettuata durante l'amplificazione.

Il segnale di fluorescenza viene emesso dal sistema Applied Biosystems 7300, provvisto di un termocicizzatore, di un laser per l'induzione della fluorescenza, di un rilevatore CCD (charge-coupled device) e di un software per l'elaborazione dei dati. Questo software ha il compito di correggere le fluttuazioni della fluorescenza dovute alla variabilità dei campioni, deve, poi, considerare la presenza di un terzo colorante non coniugato, il ROX (rodamina), che rimane a concentrazione costante per tutta la reazione. Inoltre calcola il livello del ciclo soglia (Ct), il quale indica il punto in cui la quantità di fluorescenza aumenta velocemente, quindi, rappresenta l'inizio della quantificazione dei campioni sotto forma di crescita esponenziale (Figura 3.4.1_1).

Figura 3.4.1_1: Esempio di amplification plot della Real-Time PCR per TTV (diluizione 10^{-5})



La rilevazione della quantità del DNA dei campioni è possibile grazie al confronto che viene fatto con degli standard, ricavati da DNA plasmidico, a concentrazione nota e nelle diverse diluizioni. Nella Real – Time PCR la fluorescenza è data dal reporter in seguito al taglio della sonda ibridata alla sequenza bersaglio; è importante, quindi, scegliere accuratamente le condizioni di PCR per ridurre l’amplificazione di DNA che non si è legato alla sonda.

La polimerasi impiegata in questo processo è la AmpliTaq GoldTM un’enzima termostabile che risulta essere estremamente sensibile anche verso sequenze bersaglio presenti in bassissime copie (Figure 3.4.1_2 e 3.4.1_3).

Figura 3.4.1_2: **Protocollo di Real- Time PCR per TTV**

REAGENTI	VOLUME	CONCENTRAZIONE
Mix 2x	12.5 µl	1
AMTS	1.125 µl	0.9 µM
AMTAS	1.125 µl	0.9 µM
AMTPU	0.05 µl	0.1 µM
H ₂ O	5.2 µl	
Volume totale di mix	20 µl	
Campione	5 µl	10-100 ng
Totale volume reazione	25 µl	

UNG: (95° C per 2 min)

AmpliTaq Gold (95° C per 10 min)

50 cicli (95° C per 15 sec, 60° C 1 min)

Figura 3.4.1_3: **Protocollo di Real- Time PCR per Adenovirus**

REAGENTI	VOLUME	CONCENTRAZIONE
Mix 2x	12.5 µl	1
Primer 1 (ADF)	1 µl	0.9 µM
Primer 2 (ADR)	1 µl	0.9 µM
Probe AdP 1	0.50 µl	0.225 µM
Volume totale di Mix	15 µl	
Campione	10 µl	
Totale Volume reazione	25 µl	

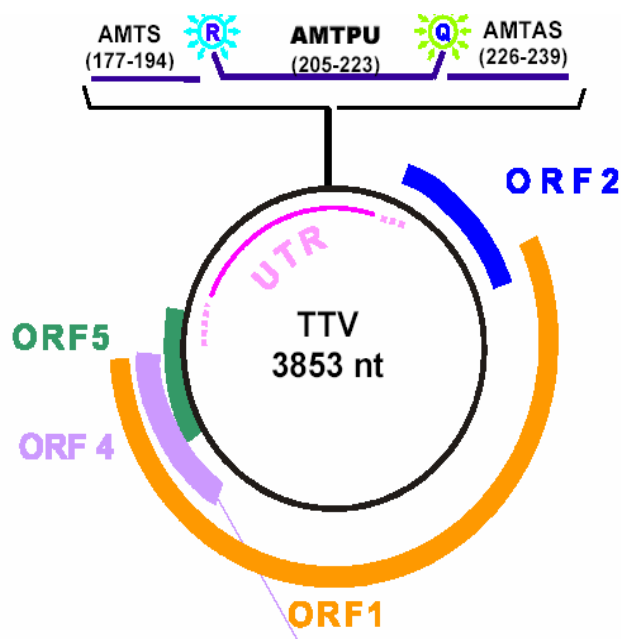
UNG: (50° C per 2 min)

AmpliTaq Gold (95° C per 10 min)

45 cicli (95° C per 15 sec, 60° C 1 min)

La regione amplificata con la Real – Time PCR per TTV è la ORF 4, mentre con la PCR qualitativa si amplifica la regione più conservata, l'UTR (Figura 3.4.1_4).

Figura 3.4.1_4: Sequenza amplificata di TTV con Real- Time PCR



I Primers utilizzati per la reazione di quantificazione di TTV (Fornai et al.2001)e Adenovirus (Henroth et al. 2002) sono riportati nella seguente tabella, nella quale viene espressa, anche la sequenza delle rispettive probe.

Tabella 3.4.1_1: Schema delle sequenze dei primers e delle probe

VIRUS E OLIGONUCLEOTIDI	SEQUENZE 5'-3'
TTV AMTS AMTAS AMTPU	GTGCCAGGTGAGTTTA AGCCGGCCAGTCC TCAAGGGGCAATTCGGGCT
ADENOVIRUS ADF ADR AdP1	CWTACATGCACATCKCSGGG RCGGGCRAAYTCCACCAG CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT

4. RISULTATI

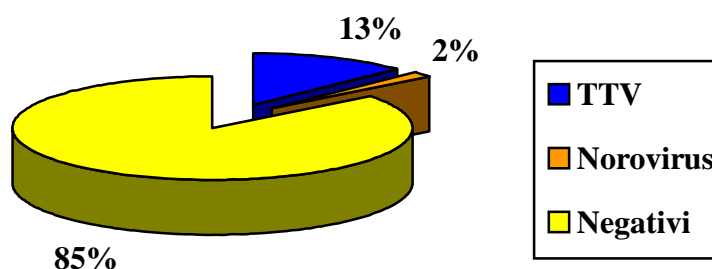
4.1. Monitoraggio dell'ambiente ospedaliero

4.1.1 Campioni di superficie

Il monitoraggio delle superfici in ambiente ospedaliero ha avuto inizio a Gennaio del 2006 e si è concluso a Febbraio 2007. In questo arco di tempo sono stati effettuati 62 prelievi di DNA virale per TTV, contemporaneamente al quale si sono ricercati altri virus, Adenovirus, Rotavirus, Norovirus gtp I e gtp II e il virus dell'epatite C. La determinazione di questi agenti virali è stata correlata all'indagine di indicatori batterici (carica batterica totale) ed ematici (emoglobina), inoltre sono stati ricercati gli Stafilococchi, i miceti e la Pseudomonas.

Queste analisi hanno mostrato positività alla nested-PCR per 8 campioni al TTV (12.90%), di cui 3 nel reparto di ematologia e gli altri nei reparti di endocrinologia, cardiotoracico, in neurologia, in oculistica e in psichiatria (Figura 4.1.1_1).

Figura 4.1.1_1: **Rappresentazione percentuale di virus sulle superfici**



Solo un campione è risultato positivo alla RT-nested PCR per Norovirus gtp II, mentre non si sono avuti casi di positività per l'emoglobina.

La superficie risultata positiva al Norovirus gtp II non è positiva al TTV, ma presenta un'elevata carica batterica, che non è stata possibile determinare perfettamente. Per quello che riguarda la correlazione tra la presenza di TTV e l'indicatori batterici, solo in un caso si ha alta carica batterica, 17,2 UFC/cm² (Grafico 4.1.1_1 e tabella 4.1.1_1).

Grafico 4.1.1_1: **Risultati della ricerca di TTV su superfici (confronto con indicatori)**

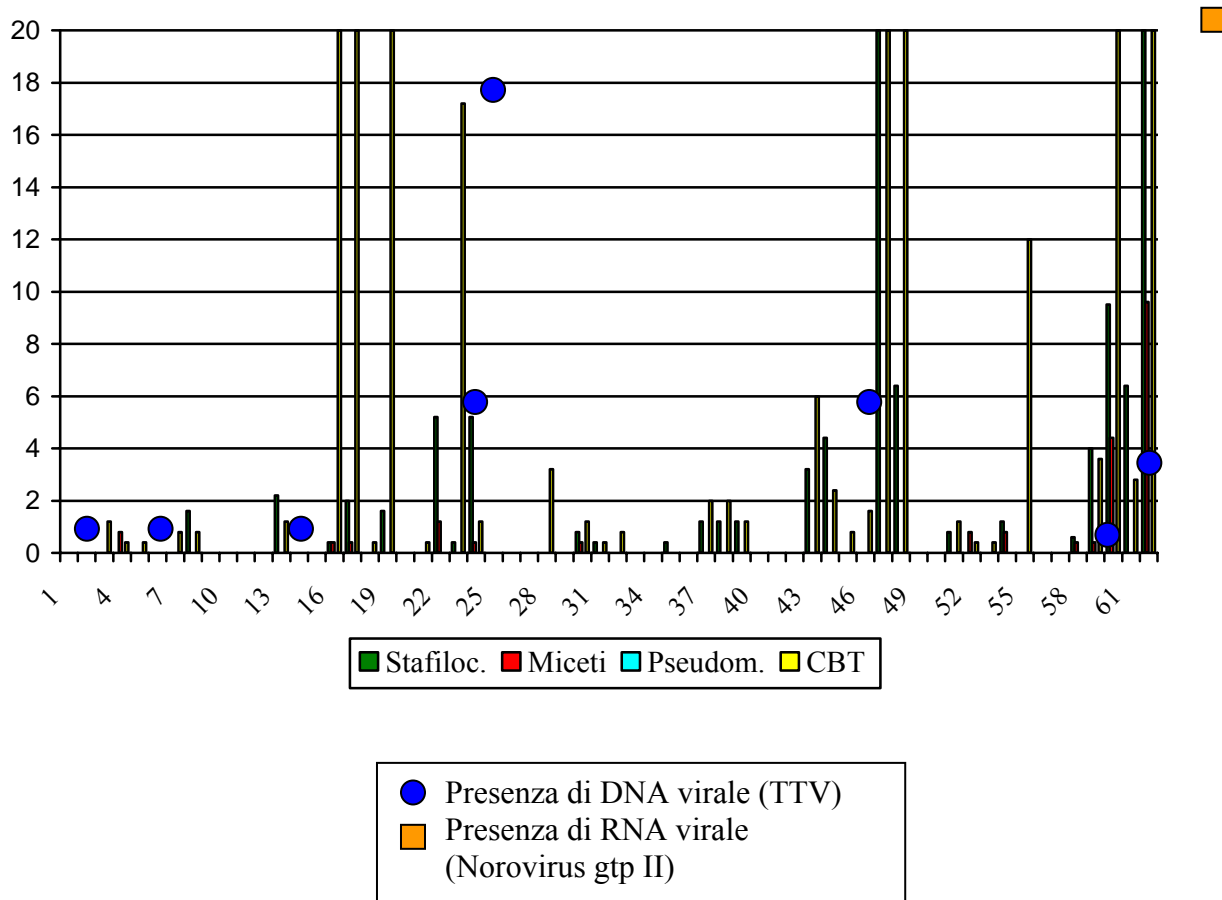


Tabella 4.1.1_1: Risultato della ricerca di TTV, virus e microrganismi su superfici

CAMPIONE N°	REPARTO	PUNTO DI PRELIEVO	TTV	Hb	HC V	ADEN O VIRU S	ROTA VIRU S	NORO VIRU S gtp I	NORO VIRU S Gtp II	STAFIL O COCCH I UFC/cm ²	MICETI UFC/cm ²	PSEUDO MONAS UFC/cm ²	CBT UFC/c m ²
1	Ematologia 24/01/06	Stanza H Parete	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
2		Stanza F Parete	+	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
3		Stanza G Parete	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	1.2
4		Medicheria Parete	-	-	-	-	-	-	-	< 1	0.8	< 1	0.4
5	Ematologia 28/02/06	Stanza Sterile D Parete	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0.4
6		Stanza H Parete	+	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
7		Stanza F Parete	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0.8
8		Medicheria Parete	-	-	-	-	-	-	-	1.6	< 1	< 1	0.8
9	Ematologia 31/03/06	Stanza H Parete	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
10		Stanza F Parete	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
11		Stanza Sterile D Parete	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
12		Medicheria Parete	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
13	Ematologia 20/02/07	Stanza H Tavolino Letto 5	-	-	-	-	-	-	-	2.20	< 1	< 1	1.2
14		Stanza F Parete Bagno	+	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	< 1
15		Stanza Sterile D Carrello	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	< 1
16	Chirurgia Generale 31/01/06	Medicheria Luce RX	-	-	-	-	-	-	-	0.4	0.4	< 1	20
17		Stanza 58 Anta Armadio	-	-	-	-	-	-	-	2.0	0.4	< 1	20
18	Odontoiatria 31/01/06	Stanza 5 Parete	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0.4
19		Ambulatorio Parete	-	-	-	-	-	-	-	1.6	< 1	< 1	20
20	Pediatria Oncoemato- logica 12/07/06	Stanza 4 TMO Armadio Medicie	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
21		Stanza 3 TMO Parete	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0.4

CAMPIONE N°	REPARTO	PUNTO DI PRELIEVO	TTV	Hb	HCV	ADENO VIRUS	ROTA VIRUS	NORO VIRUS gtp I	NORO VIRUS Gtp II	STAFILO COCCHI UFC/cm ²	MICETI UFC/cm ²	PSEUDO MONAS UFC/cm ²	CBT UFC/cm ²
22	Endocrinologia 07/02/06	Stanza 49 Parete	-	-	-	-	-	-	-	5.2	1.2	< 1	0
23		Stanza 51 Parete	+	-	-	-	-	-	-	0.4	< 1	< 1	17.2
24	Cardioracico 07/02/06	Stanza 44 Porta	+	-	-	-	-	-	-	5.2	0.4	< 1	1.2
25		Stanza 38 Tavolo	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
26	Cardioracico 02/08/06	Cardiologia Farmacia carrello	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
27		Cardioracico Pneumologia Stanza 71 2° Piano armadio	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
28	Pediatria 12/07/06	Stanza 3 Bancone	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	3.2
29		Stanza 4 Parete	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
30	Pediatria 23/11/06	Stanza 3 Porta	-	-	-	-	-	-	-	0.8	0.4	< 1	1.2
31		Stanza 4 Parete Bagno	-	-	-	-	-	-	-	0.8	< 1	< 1	0.4
32		Laboratorio di Manipolazione Cellulare	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0.8
33	Centro Ustioni 17/03/06	Palestra Interno Vasca	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
34		Pronto Soccorso Interno Vasca	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
35		Stanza 69 Comodino	-	-	-	-	-	-	-	0.4	< 1	< 1	0
36		Stanza 75 Parete	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
37	Monoblocco Terapia Intensiva 23/10/06	Box 1 Carrello Medicinali 1° Piano	-	-	-	-	-	-	-	1.2	< 1	< 1	2
38		Box 2 Tavolino 1° Piano	-	-	-	-	-	-	-	1.2	< 1	< 1	2
39		Box 3 Carrello Medicinali 1° Piano	-	-	-	-	-	-	-	1.2	< 1	< 1	3.2
40		Box 4 Parete 1° Piano	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
41	Monoblocco Terapia Intensiva 31/10/06	Sala Operatoria 1 Lampada	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
42		Sala Operatoria 1 Monitor	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0

CAMPIONE N°	REPARTO	PUNTO DI PRELIEVO	TTV	Hb	HCV	ADENO VIRUS	ROTA VIRUS	NORO VIRUS gtp I	NORO VIRUS Gtp II	STAFILO COCCHI UFC/cm ²	MICETI UFC/cm ²	PSEUDO MONAS UFC/cm ²	CBT UFC/cm ²
43	Neurologia 10/03/06	Medicheria 2° Piano Parete	-	-	-	-	-	-	-	3.2	< 1	< 1	6
44		Medicheria 1° Piano Parete	+	-	-	-	-	-	-	4.4	< 1	< 1	2.4
45	Neurologia 18/07/06	Medicheria 2° Piano Carrello	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0.8
46		Stanza Letti 1-2-3 2° Piano	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	1.6
47	Neurochirurgia 10/03/06	Stanza 16- 17 2° Piano Parete	-	-	-	-	-	-	-	20	< 1	< 1	20
48		Stanza 16- 17 1° Piano Parete	-	-	-	-	-	-	-	6.4	< 1	< 1	20
49	Neurochirurgia 18/07/06	Stanza Filtro 1° Piano Parete Lavandino	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
50		Stanza 16- 17 1° Piano Armadio	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
51	Chirurgia Generale 20/03/06	Medicheria 3° Piano Parete	-	-	-	-	-	-	-	0.8	< 1	< 1	1.2
52		Stanza 7 3° Piano Armadio	-	-	-	-	-	-	-	< 1	0.8	< 1	0.4
53		Medicheria 4° Piano Cassetto	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0.4
54		Stanza F 4° Piano Testata Letto	-	-	-	-	-	-	-	1.2	0.8	< 1	0
55	UTIC 14/02/06	Carrello	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	12
56		Stanza 12	-	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
57	Oculistica 14/02/06	Carrello Infermeria	+	-	-	-	-	-	-	< 1	< 1	< 1	0
58		Stanza 1 Parete dietro il letto	-	-	-	-	-	-	-	0.6	0.4	< 1	0
59	Psichiatria 23/02/06	Medicheria Carrello	+	-	-	-	-	-	-	4	0.4	< 1	3.6
60		Bagno Lavandino	-	-	-	-	-	-	-	9.5	4.4	< 1	20
61	V° Chirurgico 23/02/06	Medicheria Carrello	-	-	-	-	-	-	-	6.4	< 1	< 1	2.8
62		Bagno Lavandino	-	-	-	-	-	-	+	20	9.6	< 1	20

4.1.2 Campioni di aerosol

Il monitoraggio dell'aerosol si è svolto in concomitanza con quello delle superfici, sono stati effettuati 27 campionamenti nei diversi reparti ospedalieri per la ricerca di TTV associata alla analisi degli altri virus e di indicatori batterici. Nell'aria vengono ricercati anche gli enterococchi oltre a miceti, stafilococchi e Pseudomonas, mentre non si rileva la presenza di emoglobina.

L'analisi di questi campioni ha messo in evidenza la positività per 6 di questi al TTV (22,22%) (Figura 4.1.2_1), per i quali non si ha presenza di altri virus né alta carica batterica (Grafico 4.1.2_1 e Tabella 4.1.2_1). La contaminazione microbica è stata espressa in UFC/m³.

Grafico 4.1.2_1: **Risultati della ricerca in aerosol di TTV (confronto con indicatori)**

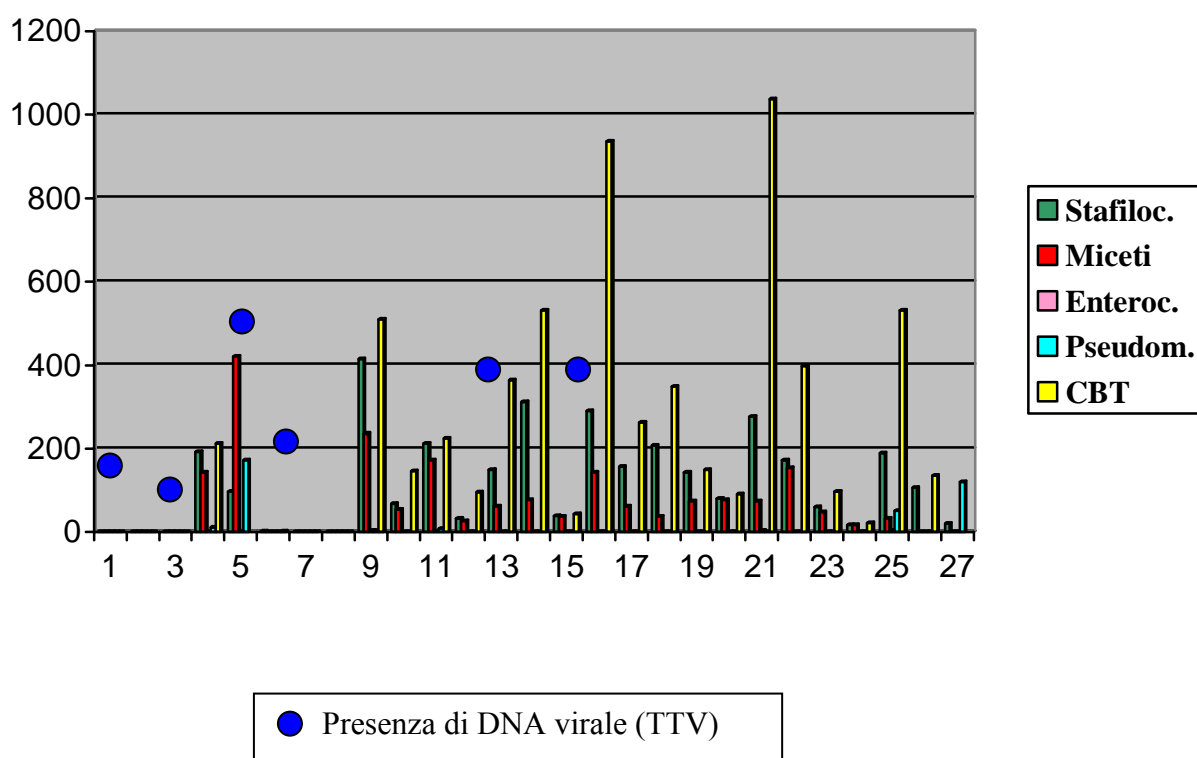
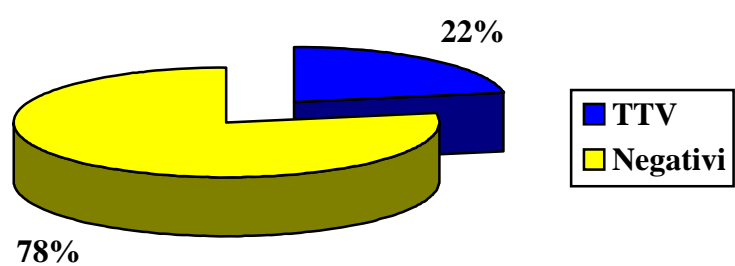


Tabella 4.1.2_1: **Risultato della ricerca di TTV, microrganismi e virus in aerosol.**

CAMPIONE N°	REPARTO	PUNTO DI PRELIEVO	TTV	HCV	ADENO VIRUS	ROTA VIRUS	NORO VIRUS gtp I	NORO VIRUS gtp II	STAFILO COCCHI UFC/m ³	MICETI UFC/m ³	ENTERO COCCHI UFC/m ³	PSEUDO MONAS UFC/m ³	CBT UFC/m ³
1	Ematologia 28/02/06	Stanza Sterile D	+	-	-	-	-	-	/	/	/	/	/
2		Stanza H	-	-	-	-	-	-	/	/	/	/	/
3		Corridoio	+	-	-	-	-	-	/	/	/	/	/
4	Ematologia 31/03/06	Corridoio	-	-	-	-	-	-	193	144	< 1	12	213
5		Stanza H	+	-	-	-	-	-	98	42	< 1	< 1	173
6		Stanza Sterile D	+	-	-	-	-	-	2	< 1	< 1	< 1	2
7	Ematologia 20/02/07	Stanza H	-	-	-	-	-	-	/	/	/	/	/
8		Stanza F	-	-	-	-	-	-	/	/	/	/	/
9	Monoblocco Terapia Intensiva 23/10/06	Box 1	-	-	-	-	-	-	414	236	4	4	510
10		Box 2	-	-	-	-	-	-	68	55	< 1	< 1	146
11		Box 3	-	-	-	-	-	-	213	173	< 1	8	225
12	Monoblocco Terapia Intensiva 31/10/06	Sala Operatoria 1	-	-	-	-	-	-	33	27	< 1	< 1	96
13	IV° Chirurgico 07/03/06	Subintensiva	+	-	-	-	-	-	149	62	< 1	< 1	364
14		Pronto Soccorso	-	-	-	-	-	-	312	77	< 1	< 1	531
15	Neurochirurgia 10/03/06	Stanza 16-17 1° Piano	+	-	-	-	-	-	39	37	< 1	< 1	44
16		Filtro Sala Operatoria	-	-	-	-	-	-	290	144	< 1	< 1	935
17	Neurochirurgia 18/07/06	Stanza Filtro	-	-	-	-	-	-	157	62	< 1	< 1	263
18		Stanza 16-17 1° Piano	-	-	-	-	-	-	207	37	< 1	< 1	349
19	Centro Ustioni 17/03/06	Corridoio	-	-	-	-	-	-	144	75	< 1	< 1	149
20		Pronto Soccorso	-	-	-	-	-	-	80	77	< 1	< 1	91
21	Chirurgia Generale 20/03/06	Medicheria 3° Piano	-	-	-	-	-	-	277	75	4	< 1	1037
22		Stanza F	-	-	-	-	-	-	173	154	< 1	< 1	397
23	Pediatria	Stanza 4	-	-	-	-	-	-	61	48	< 1	< 1	98
24	Oncoematologica 12/07/06	Stanza 3 TMO	-	-	-	-	-	-	18	18	< 1	< 1	22
25	Pediatria Oncoematologica 23/11/06	Laboratorio di Manipolazione Cellulare	-	-	-	-	-	-	190	33	4	52	531
26	Cardiochirurgia 02/08/06	Farmacia	-	-	-	-	-	-	106	< 1	< 1	< 1	136
27	Cardioracico e Pneumologia 02/08/06	Stanza 71 2° Piano	-	-	-	-	-	-	20	< 1	< 1	< 1	120

Figura 4.1.2_1: Percentuali di campioni positivi per TTV in aerosol

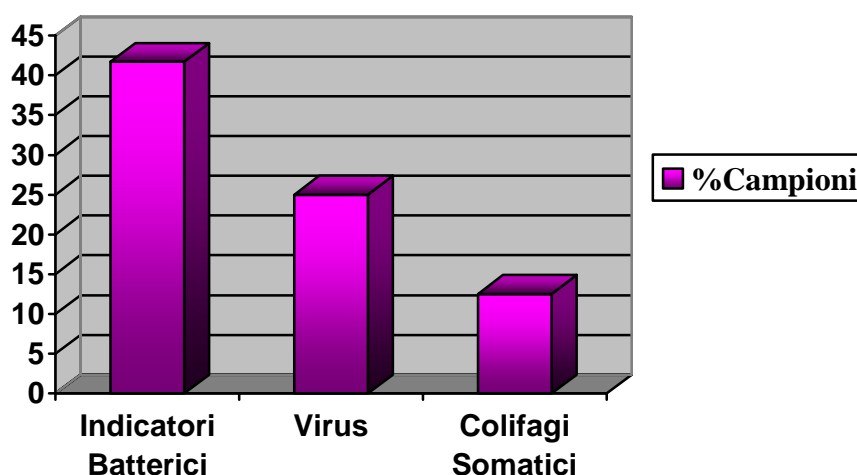


4.2. Monitoraggio delle matrici ambientali

4.2.1 Acque di balneazione

Il monitoraggio delle acque di balneazione ha previsto il campionamento di 24 campioni di acque, di cui il 25% è risultato positivo alla presenza di virus, mentre il 41,7% ha mostrato concentrazioni misurabili di indicatori batterici attraverso l'uso di metodi ISO, senza però superare i limiti previsti dalla normativa sulle acque di balneazione (Decreto Legislativo n°155/88). Il 12,5% dei campioni è risultato positivo ai colifagi somatici (Figura 4.2.1_1).

Figura 4.2.1_1: **Risultati totali del monitoraggio in termini di percentuale di campioni positivi per indicatori batterici, virus e colifagi somatici**

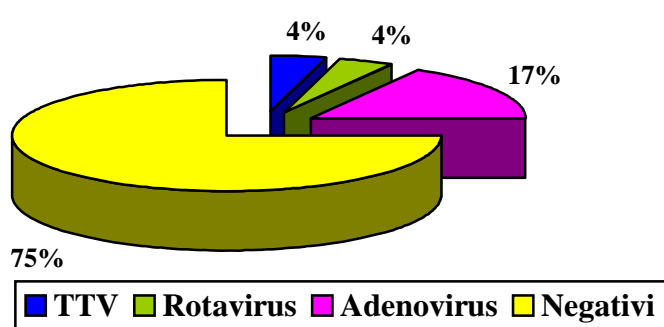


Il 16,7% dei campioni idrici analizzati è risultato positivo alla nested-PCR per Adenovirus, mentre solo il 4,7% è positivo rispettivamente per TTV e Rotavirus. Inoltre non si ha positività di uno stesso campione per più virus identificati e non è presente

corrispondenza batterica e colifagica, ad eccezione di un caso in cui è stata rilevata una quantità pari a 15 UFC/100ml di Enterococchi intestinali ed il campione è risultato positivo per TTV (Figura 4.2.1_2).

Figura 4.2.1_2: Percentuale di positivi alla PCR sul totale di campioni idrici

analizzati



L'analisi degli indicatori batterici ha messo in evidenza la presenza di Enterococchi intestinali ed *E.coli* rispettivamente nel 8,34% e nel 29,2% dei campioni analizzati.

I colifagi somatici sono stati rilevati nel 12,5% dei campioni, con una concentrazione massima di 100 UFP/100ml.

4.2.1.1. Foce del Fiume Morto

Il monitoraggio virologico di questo punto di prelievo ha dimostrato una percentuale virale complessiva del 20,8%, di cui il 12,5% è data dalla presenza di adenovirus ed il restante 8,3% da TTV e Rotavirus.

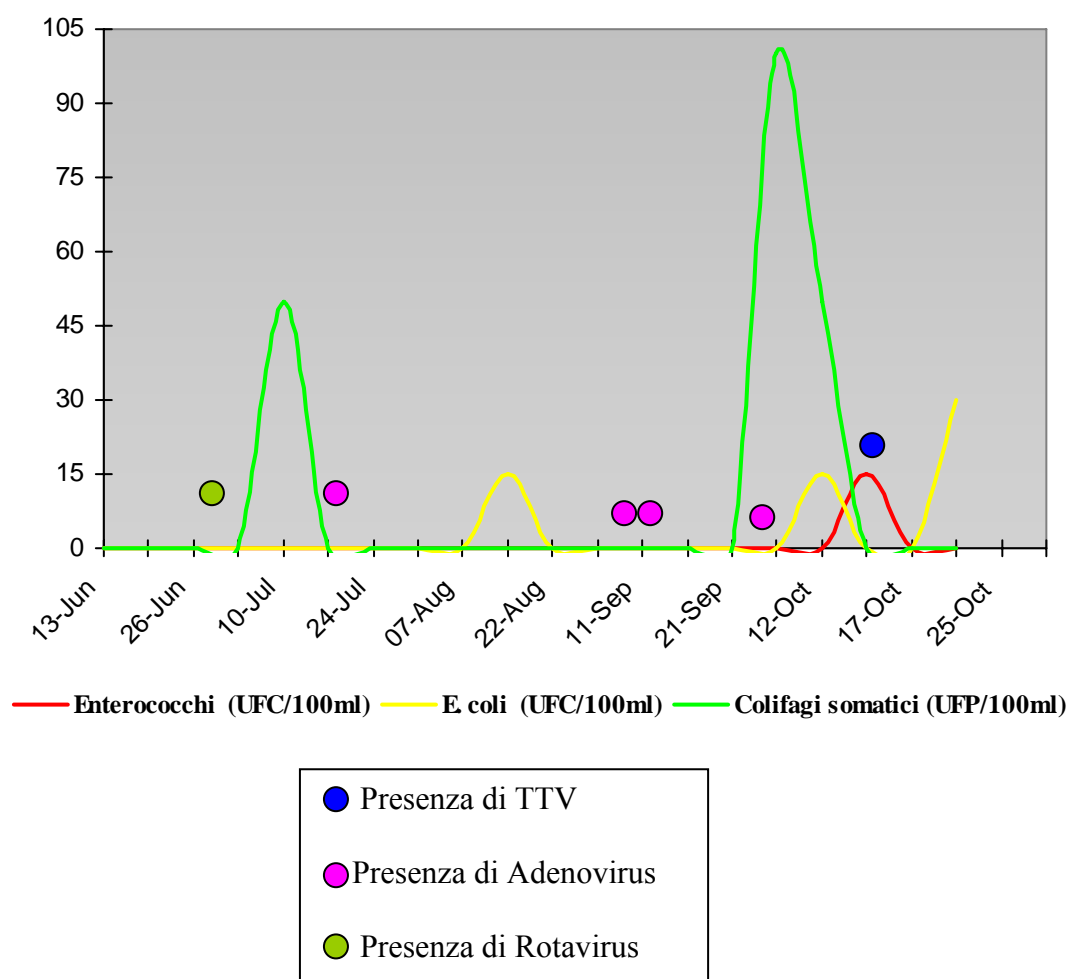
E.coli è stato rilevato nel 29,16% dei campioni analizzati, secondo le norme ISO 9308-3 ed ha manifestato una concentrazione massima di 30 UFC/100ml il 19 Ottobre 2006.

Gli Enterococchi intestinali sono stati rilevati solo nel 8,3% dei campioni analizzati con il metodo delle norme ISO 7899-1 ed hanno presentato una quantità pari a 15 UFC/100ml.

Per quanto riguarda gli indicatori fagici solamente 3 campionamenti su 24 hanno riportato la presenza di colifagi somatici: la concentrazione maggiore è risultata di 100 UFC/100 ml nel campionamento del 10 ottobre 2006.

La distribuzione degli indicatori batterici e dei colifagi somatici durante il periodo in cui si è svolto il monitoraggio delle acque di balneazione a livello della foce del Fiume Morto è riportato in figura 4.2.1.1_1 in correlazione con la presenza di virus.

Figura 4.2.1.1_1: **Distribuzione degli indicatori batterici e dei colifagi somatici in relazione ai virus a livello della foce del Fiume Morto**



4.2.1.2. Bocca d'Arno

Il monitoraggio virologico della Bocca d'Arno ha previsto il campionamento di un numero minore di prelievi rispetto a quelli effettuati alla foce del Fiume Morto, infatti si sono svolti 5 campionamenti, di cui solo uno è risultato positivo ad adenovirus (20%). Inoltre non è stata messa in evidenza né la presenza di indicatori batterici, né quella di colifagi somatici.

4.2.2. Acque minerali

L'analisi delle acque minerali ha previsto la ricerca di virus enterici ed indicatori virali, quali i colifagi somatici, sia nei campioni di sorgente che nell'imbottigliato.

Sono stati analizzati 25 campioni, tra sorgente ed imbottigliato, nei quali non sono stati ritrovati né virus patogeni, né colifagi somatici, indice di una buona qualità della falda acquifera e del processo di lavorazione dell'acqua stessa.

4.3. Prove di resistenza del genoma virale alla disinfezione su superfici

Il possibile impiego del TTV come indicatore di contaminazione virale delle superfici in ambiente ospedaliero ha portato all'allestimento di test di recupero per verificare la presenza dello stesso e la sua capacità infettante. Queste prove sono state effettuate in parallelo alla ricerca di un virus ad elevata resistenza ambientale, l'adenovirus.

La fase iniziale di questo studio ha previsto la valutazione del metodo di recupero, con estratto di carne al 3% a pH 9, dei due virus da superfici artificialmente contaminate senza l'uso di disinfettante e l'analisi del DNA estratto per mezzo della Real-Time PCR.

I risultati ottenuti mettono in evidenza la quantità di genoma virale che viene recuperato, conoscendo il titolo virale da cui si parte, sono espressi in logaritmi delle copie genomiche/ml (Tabella 4.3.1_1 e Tabella 4.3.2_1).

Tabella 4.3.1_1: Quantità di genoma virale di TTV recuperato su superfici senza l'uso del disinfettante

	1° PROVA	2° PROVA	3° PROVA	Media Prove
TTV2	4,4801	5,2107	5,749	5,1466
TTV5	3,884	6,143	5,2735	5,100166667
TTV10	3,3205	5,303	5,5726	4,732033333
TTV20	4,5413	2,87	6,168	4,526433333
TTV30	4,81	/	5,384	5,097

Tabella 4.3.2_2: Quantità di genoma virale di Adenovirus recuperato su superfici senza l'uso del disinfettante

	1° PROVA	2° PROVA	3° PROVA	Media Prove
AdV2	6,0513	4,2361	5,448	5,245133333
AdV5	/	4,9832	4,972	4,9776
AdV10	/	5,04367	5,272	5,157835
AdV20	/	5,13935	5,8671	5,503225
AdV30	/	4,758	5,0831	4,92055

La fase successiva, rispetto alla precedente, ha lo scopo di valutare l'azione del disinfettante, a diverse concentrazioni, utilizzato per la sanificazione delle superfici in ambiente nosocomiale.

Sono state allestite prove con due diluizione del prodotto commerciale impiegato nella pulizia di materiali da lavoro; la prima di queste con valore pari a 10^{-5} , in cui la concentrazione di cloro equivale a 0.3 ppm, la seconda diluizione è di 10^{-4} , in cui la quantità di cloro corrisponde a 2.90 ppm (tabella 4.3.2_3, tabella 4.3.2_4, tabella 4.3.2_5 e 4.3.2_6).

L'analisi di questi test è stata effettuata con la tecnica della Real-Time PCR, sia per adenovirus che per TTV, che mette in risalto la quantità di materiale genetico presente nel campione in base allo standard di riferimento.

Tabella 4.3.2_3: **Quantità di genoma virale di TTV recuperato su superfici con l'uso del disinfettante diluito 10^{-5}**

	1° PROVA	2° PROVA	3° PROVA	Media Prove
TTV2	7,806	5,837	5,485	6,376
TTV5	7,0817	5,832	4,9903	5,968
TTV10	6,957	5,975	5,537	6,156333333
TTV20	6,366	5,3113	5,299	5,658766667
TTV30	7,1061	5,8132	5,693	6,2041
POS	6,57863	5,9315	5,3967	5,968943333

Tabella 4.3.2_4: **Quantità di genoma virale di TTV recuperato su superfici con l'uso del disinfettante diluito 10^{-4}**

	1° PROVA	2° PROVA	Media Prove
TTV2	3,4941	3,273	3,38355
TTV5	4,2378	3,1085	3,67315
TTV10	4,542	3,9335	4,23775
TTV20	4,4978	4,0242	4,261
TTV30	4,3742	2,8932	3,6337
POS	4,423	2,6721	3,54755

Tabella 4.3.2_5: **Quantità di genoma virale di adenovirus recuperato su superfici con l'uso del disinfettante 10^{-5}**

	1° PROVA	2° PROVA	3° PROVA	Media Prove
AdV2	5,0136	5,0397	6,6547	5,569333333
AdV5	5,1472	5,1058	6,9659	5,739633333
AdV10	5,3786	5,05011	6,6939	5,707536667
AdV20	5,1241	5,1796	6,7317	5,678466667
AdV30	4,7628	5,4387	6,44771	5,549736667
POS	5,6562	5,72077	7,4083	6,261756667

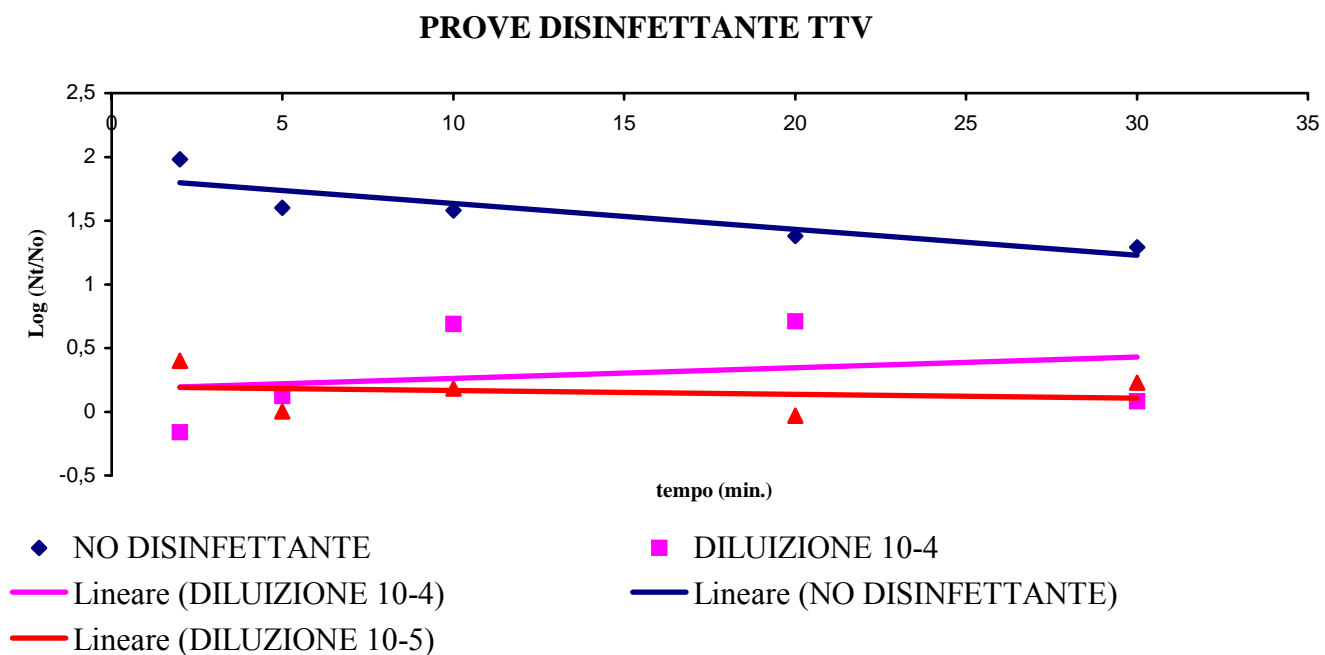
Tabella 4.3.2_6: **Quantità di genoma virale di adenovirus recuperato su superfici con l'uso del disinfettante 10^{-4}**

	1° PROVA	2° PROVA	Media Prove
AdV2	4,507	5,175	4,841
AdV5	4,8795	4,928	4,90375
AdV10	4,9375	5,27	5,10375
AdV20	4,775	5,5002	5,1376
AdV30	5,414	4,9968	5,2054
POS	5,66	5,3923	5,52615

Per avere un quadro generale sull'azione del disinfettante sul virus è possibile correlare i risultati ottenuti in copie gnomiche/ml, attraverso il test per il coefficiente di correlazione (R^2) di Pearson, che indica la forza di associazione tra due variabili distribuite normalmente.

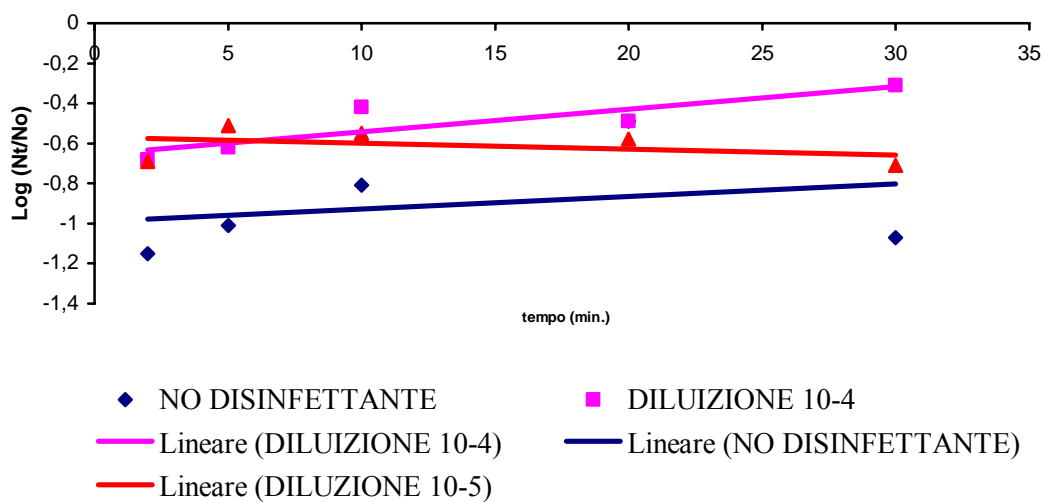
Il valore del coefficiente di correlazione è compreso tra -1 e +1, se la relazione tra le due variabili è stretta il valore in assoluto R^2 di sarà vicino all'unità, viceversa se la correlazione è debole la R^2 è prossima a 0. La determinazione di questo coefficiente ci permette di calcolare il test statistico t per i campioni analizzati e confrontarlo con il valore tabulato a due diversi indici di probabilità, $p = 0.05$ e $p = 0.01$. Se il valore di t calcolato è maggiore di quello tabulato esiste un'associazione tra le due variabili analizzate.

Grafico 4.3.2_a: Risultati delle prove di TTV con e senza disinfettante (copie genomiche/ml)



Dil. 10^{-4} $R^2 = 0.0609$ $T = 0.79$
Dil. 10^{-5} $R^2 = 0.0379$ $T = 0.396$
No Dil. $R^2 = 0.7834$ $T = 3.80$

Grafico 4.3.2_b: Risultati delle prove di Adenovirus con e senza disinfettante (copie genomiche/ml)



Dil. 10^{-4} $R^2 = 0.7608$ $T = 3.56$
Dil. 10^{-5} $R^2 = 0.1549$ $t = 0.855$
No Dil. $R^2 = 0.0757$ $t = 0.572$

5. DISCUSSIONE

La ricerca degli agenti virali patogeni nelle matrici ambientali, presenta dei grossi limiti legati alla inadeguatezza delle tecniche di rilevamento, poco sensibili e con basso indice di ripetitibilità e riproducibilità (Aulicino et al., 2005) e alla mancanza di indicatori di contaminazione biologica da poter correlare con la possibile presenza di virus.

Per ovviare a queste carenze negli ultimi anni è stato proposto l'uso di un virus, il TTVirus, come ipotetico indicatore di contaminazione virale per l'ambiente nosocomiale, grazie alla capacità che ha di diffondersi (Matsubara et. al., 2001; Niel et Lampe, 2001) alla sua scarsa patogenicità (Griffiths et. al., 1999; Mushahwar et. al., 2000) e alle molteplici vie di trasmissione (Gallian et al., 2000; Fornai et al., 2001; Maggi et al., 2003). Tali caratteristiche fanno supporre un suo utilizzo, come indicatore, anche nelle matrici idriche.

L'indagine di questo agente virale è stata effettuata in primo luogo nell'ambiente sanitario e successivamente ampliata agli ambienti acquatici, in associazione alla identificazione di indicatori classici di contaminazione biologica.

Il monitoraggio delle superfici ospedaliere ha messo in evidenza la presenza di TTV DNA nel 13% (8/62) dei punti analizzati, per i quali non si è verificata associazione con virus patogeni e l'emoglobina, indicatore di contaminazione ematica. Per quattro dei campioni risultati positivi all'agente virale esaminato si è rilevata un'alta carica batterica totale, in relazione ai parametri prestabiliti dall'OMS. Dobbiamo tenere presente che non si ha una vera e propria normativa che regolamenti la quantità di microrganismi sulle superfici nosocomiali, atta a stabilire il loro livello igienico. Nei reparti di Endocrinologia, Neurologia e Psichiatria la presenza del TTV è associata ad

un'alta carica batterica, più di 2 UFC/cm², denotando un livello igienico inadeguato, mentre nel reparto Cardiotoracico il livello di igiene riscontrato è medio.

La correlazione tra virus e indicatori di contaminazione biologica permette di valutare l'efficienza dei processi di disinfezione delle superfici, poiché i virus sono più resistenti rispetto ai batteri, di conseguenza il fatto che si siano rilevati entrambi in alcuni punti di prelievo fa supporre quanto sia inadeguato la sanitizzazione delle superfici (Kramer et al., 2006).

L'analisi di piani di lavoro è risultata positiva per norovirus genotipo II, in un campione prelevato nel reparto del V° Chirurgico, precisamente sul lavandino di un bagno di una stanza di degenza, in associazione con un'alta carica microbica. Bisogna tener presente che, comunque, la identificazione di questo virus patogeno, anche se in associazione con un'elevata carica microbica, non è rilevante ai fini della ricerca a causa della sua singolarità.

In ambiente sanitario è stato effettuato, anche, il monitoraggio dell'aerosol che ha mostrato la presenza di TTV DNA in 6 campioni su 27. Per due campioni prelevati nel reparto di Ematologia, non è stato possibile effettuare la conta microbica per problemi verificatisi durante la loro analisi; in un altro campione, invece, la carica batterica stimata in 173 UFC/m³ è risultata molto vicina al limite di riferimento pari a 200 UFC/m³. Negli altri punti di prelievo, in cui si è rilevata la presenza del virus, solo nel reparto di subintensiva del IV° Chirurgico la carica batterica totale era di 364 UFC/m³ oltre i limiti prestabiliti dall'OMS nella Nota Applicativa.. La ricerca di virus patogeni non ha avuto riscontri positivi, mentre se si valuta la quantità degli indicatori classici di contaminazione biologica vediamo che in alcuni reparti è molto elevata, indice, questo, di probabile inefficienza dei filtri impiegati nella sanificazione dell'aria (EPHA). La ricerca dei batteri viene effettuata attraverso colture cellulari che prevedono la replicazione del microrganismo stesso, indicandone, quindi, l'infettività. Confrontando i

valori di carica batterica rilevati sulle superfici con i limiti prestabiliti dall'OMS, si può concludere sul 13% (8/62) punti di campionamento analizzati si ha un livello di igiene medio, mentre nel 24.2% (15/62) il livello igienico è inadeguato. Questi risultati ci fanno supporre che i batteri abbiano una notevole resistenza ai processi di disinfezione, che sono efficaci nella eliminazione del virione, ma non in quella del genoma virale, anche se la sua rilevazione non è indice di vitalità (Sobsey et al., 1998).

Il ritrovamento di virus nell'aerosol è spiegato dal fatto che non si ha una disinfezione diretta dell'ambiente monitorato; l'unico punto su cui porre l'attenzione, per le difficoltà di interpretazione, è il ritrovamento di TTV in una stanza sterile del reparto di ematologia, nella quale sono obbligatori filtri assoluti.

L'analisi dell'ambiente ospedaliero mette in evidenza quanto si difficile stimare una relazione tra gli indicatori di contaminazione biologica, il TTV, proposto come ipotetico indicatore di contaminazione virale e gli altri agenti virali patogeni.

L'assenza di campioni positivi per i virus patogeni può dipendere dalla scarsa resistenza che questi hanno nei confronti dei disinfettanti che vengono impiegati per la sanitizzazione delle superfici, ad esempio è stato dimostrato che i *Calicivirus* vengono inattivati con ipoclorito di sodio a temperatura ambiente per 10- 30 minuti, in cui la quantità di cloro era pari a 3,00 ppm (Duizer et al., 2004).

La stabilità ambientale del TTV e la sua trasmissione per via oro- fecale ne suggeriscono l'ipotesi di un possibile indicatore di contaminazione, non solo nell'ambiente ospedaliero, ma anche nelle diverse matrici, tra le quali sono state prese in considerazione quelle idriche, in seguito a studi svolti sulle acque di impianti di depurazione (Haramoto et al., 2005) e su corsi d'acqua superficiali che ricevono da un impianto di smaltimento dei liquami (Verani et al., 2005). Da un'analisi preliminare effettuata sul liquame in entrata ad un impianto di depurazione è stato accertato come i trattamenti di decantazione dello stesso riducono la presenza del virus in acque reflue.

L'indagine svolta su 24 campioni di acque di balneazione ha rilevato la presenza di un solo campione positivo al TTV verso la metà di Ottobre, suggerendo la sua possibile diluizione nell'ambiente e la probabile interferenza con fattori fisici, chimici e biologici presenti nella matrice stessa (Gantzer et al., 2002). La presenza di questo agente virale non è stata correlata con la rilevazione di indicatori virali patogeni, né con indicatori batterici che presentino un valore al di sopra dei limiti prestabiliti dalla direttiva 7/2006/CEE.

Il ritrovamento di adenovirus in acque di mare è documentato da molti studi (Grohmann et al., 1993, Pina et al., 1998, Vantarakis et al., 2005, Fong, 2005), rispetto al TTV per il quale sappiamo poco sulla sua diffusione e resistenza nell'ambiente idrico. Sono stati rilevati tre campioni positivi ad adenovirus di tipo 41, nel mese di Ottobre presso la foce del fiume Morto, mentre un solo campione è stato ritrovato a Bocca d'Arno nel periodo estivo. I sierotipi 41 ed 40 sono i maggiori responsabili di gastroenteriti infantili (Li et al., 2004e Wyn-Jones et al., 2001), inoltre sono risultati più resistenti, nei liquami e nelle matrici idriche ambientali, rispetto ai batteri indicatori di contaminazione fecale (Enriquez et al., 1995), nel nostro caso, infatti non si ha una corrispondenza con *E.coli*, né con gli enterococchi. Solo in punto di prelievo si è rilevata un'alta carica di indicatori di contaminazione virale, pari a 100 UFP/100ml, per i quali manca una correlazione con i virus enterici e con gli indicatori fecali.

Non è stata messa in evidenza la presenza di altri virus patogeni, solo in un caso si è avuta positività per rotavirus..

L'elevata diluizione che si verifica in ambiente idrico e la presenza di fattori inattivanti (temperatura, pH, salinità, ossigeno disciolto, raggi UV, ecc.), influenzano la sopravvivenza dei virus e permettono di mantenere la quantità degli indicatori di contaminazione fecale nei limiti prestabiliti della direttiva Europea.

Attraverso questo monitoraggio è stato possibile evidenziare una certa contaminazione da parte di virus enterici dei corpi idrici e l'inefficienza della correlazione di questi agenti virali con indicatori classici di contaminazione stabiliti dalla legge (Vantarakis et al., 2005, Jiang, 2001, Noble, 2001, De Donno et al., 2005).

Le analisi effettuate sulle acque di balneazione sono state eseguite, anche, su acque minerali, per le quali non si ammettono interventi che possano alterarne le caratteristiche microbiche (Decreto Legislativo 105/92) e non si hanno parametri per la identificazione di virus patogeni.

Negli ultimi anni, la sempre più diffusa contaminazione delle falde acquifere sta ponendo l'attenzione verso l'indagine di questi microrganismi. Le analisi effettuate su 25 campioni, non hanno messo in evidenza né la presenza di virus, né quella di colifagi somatici, utilizzati come indicatori di contaminazione virale.

L'utilizzo di tecniche molecolari ha permesso di evidenziare il genoma dei virus ricercati senza avere informazioni riguardo all'infettività. Per tali motivi in relazione alle superfici sono state allestite delle prove con lo scopo di valutare l'efficienza dei disinfettanti utilizzati per la sanitizzazione di tali matrici nei confronti dei due ipotetici indicatori, l'adenovirus e il TTV. Le prove sono state svolte in assenza di disinfettante e con diluizioni diverse dello stesso (10^{-4} , in cui la quantità di cloro è pari a 2.90 ppm e 10^{-5} dove il cloro è presente in concentrazione di 0.3 ppm), hanno messo in evidenza la quantità di genoma virale che viene recuperato in copie genomiche /ml, attraverso la Real- Time PCR. In seguito alla elaborazione di questi dati si è riscontrato una discordanza tra i valori di copie genomiche per una stessa diluizione nei diversi tempi di recupero.

Nelle prove relative all'adenovirus con diluizione dell'ipoclorito pari a 10^{-4} , si è riscontrato un innalzamento della quantità genomica con l'aumentare del tempo di contatto; nonostante queste evidenze, l'analisi del coefficiente di correlazione mostra un

valore significativo. Nella prova con diluizione pari a 10^{-5} si verifica una diminuzione del titolo virale, senza manifestare correlazione, così come nel test in cui non viene impiegato il disinfettante.

L'elaborazione dei dati riguardanti i test effettuati per TTV mostrano una notevole correlazione in assenza di disinfettante, mentre non danno valori significativi per le prove avvenute con l'uso del disinfettante.

L'esito di queste prove può essere influenzato da fattori inerenti alla metodica utilizzata e alla manipolazione da parte dell'operatore.

6. CONCLUSIONI

La valutazione del rischio di esposizione ad agenti virali è di grande interesse in ambienti occupazionali sanitari e non, sia per la rilevanza delle patologie virali, sia per la carenza di indicatori affidabili. Da alcuni anni è in corso di studio il possibile impiego del TTVirus come indicatore virale nell'ambiente a causa della sua notevole diffusione nella popolazione e resistenza ambientale. Poiché la trasmissione del TTV avviene principalmente per via orofecale e parenterale, si può ipotizzare l'impiego del TTV come indicatore anche in matrici ambientali.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di ricercare questo virus nelle diverse matrici ambientali utilizzando tecniche biomolecolari (PCR) già standardizzate in studi precedenti.

Il monitoraggio ambientale di TTV è stato effettuato su aerosol, superfici e matrici idriche insieme alla ricerca dei seguenti parametri: CBT in aerosol e superfici ospedaliere, Coliformi Fecali e Totali, Enterococchi, *E. coli* in acque di balneazione, emoglobina come indicatore di contaminazione ematica in superfici ospedaliere, Norovirus, Rotavirus e Adenovirus in tutte le matrici

Il monitoraggio condotto in ambienti sanitari ha permesso di rilevare che l'13% dei campioni di superfici e il 22% campioni di aerosol erano positivi per TTV, fra gli altri virus è stato rilevato solo un norovirus, la cui importanza epidemiologica in ambiente ospedaliero è molto rilevante. I campioni positivi per TTV DNA su superfici, non sono risultati correlati con la carica batterica totale: in molti casi infatti questa era al di sotto di 1UFC/cm². Invece i campioni di aerosol positivi per TTV sono, stati quasi sempre, associati ad alta carica batterica.

I campioni di acque di balneazione sono risultati positivi per TTV nel 4,1% dei per Adenovirus nel 15%.

Dal momento che il TTV non può essere coltivato su cellule, la sua presenza nell'ambiente esaminato non è indice di infettività. Le tecniche biomolecolari dimostrano la presenza di genoma virale, lasciando aperto il quesito sul reale significato della presenza di DNA, che potrebbe essere un indice di contaminazione regressa o di virus vitale, capace di resistere a trattamenti di disinfezione. La verifica di questa ipotesi attraverso prove sperimentali su superfici contaminate artificialmente, non ha ancora prodotto risultati conclusivi, probabilmente a causa della presenza di inibitori della PCR che alterano i dati quantitativi. Quindi l'utilizzo di TTV come indicatore, sebbene incoraggiato dall'ampia diffusione rilevata, non potrà essere proposto finché non sarà chiara la relazione fra DNA rilevato ed infettività.

7. BIBLIOGRAFIA

Abad FX, Pinto RM., Bosch A. (1997): Disinfection of human enteric viruses on fomites. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**: 107-111

Abad FX, Pinto RM., Bosch A. (1994): Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3704-3710

Abe K., Inami T., Asano K., Miyoschi C., Masaki N., Hayaschi S., Ischikawa K.I., Takebe Y., Win K. M., Ei- Zayadi A. R., Han K. H., and Zhang D. Y.,1999: TT virus infection is widespread in the general- populations from different geographic regions. *J. Clin. Microbiol.*,**37**:2703- 2705;

Aitken C., Jeffries DJ 2001: Nosocomial spread of viral disease. *Clinical Microbiology Rewiews*, **14**: 528-546;

Allard A., Girones R., Juto P., Wadell G. (1990). Polymerase chain reaction for detection of adenovirus in stool samples. *J. Clin. Microbiol.*, **28**: 2659-2667;

Allard A., Albinsson B., Wadell. G. (1992). Detection of Adenoviruses in stool from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology*, **37**: 149-157;

American Public Health Association (1970): A comparative microbiological evaluation of floor- cleaning procedures in hospital patient rooms. *HIS* **7**, 256-264;

Azzi, A., De Santis, R., Morfini, M., Zakrzewska, K., Musso, R., Santagostino, E., Castaman, G. (2001): TT virus contaminates first-generation recombinant factor VIII concentrates. *Blood* **98**: 2571-2573;

Beltrami E.M., Williams I.T., Shapiro C.N., Chamberland M.E. (2000): Risk and management of blood-borne infections in health care workers. *Clin.*

Microbiol. Rev. 13: 385-407;

Benbough J.E. (1971): Some factor affecting the survival of airborne viruses. *J. gen. Virol.* 10: 209-220;

Bendinelli, M., Pistello, M., Maggi, F., Fornai, C., Freer, G., Vatteroni, M. L. (2001): Molecular properties, biology and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 98-113;

Berendt Rf., Dorsey El., Hearn Hj. (1971): Virucidal properties of light and SO 2. II. Effect of a low gas concentration on aerosolized virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138: 1005-1008;

Biagini, P., Todd, D., Bendinelli, M. & 8 other authors (2005). Anellovirus. In *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 335–341. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. London: Academic Press;

Biagini P., Gallian P., Attoui H., Cantaloube J. F., De Micco P., De Lamballerie X. (1999): determination and phylogenetic analysis of partial sequences from TT virus isolates. *Journal of General Virology* **80**: 419-424;

Biziagos E., Passagot J., CranceJ.M., Deloice R., 1988: Long-term survival of Hepatitis A virus and Poliovirus type 1 in mineral water. *Appl. And Envirol. Microbiol.*, 54: 2705-2710;

Breindl, M. 1971. The structure of heated poliovirus particles. *J. Gen. Virol.* 11:147-156;

Camellini L., Battistini P., Cavalchi M. (2002): Indoor pollution microbiologico. Rassegna bibliografica ed esperienze dirette. I quaderni di ARPA Emilia-Romagna;

Carducci A., Verani M., Casini B., et al. (2002): Detection and potential indicator of the presence of hepatitis C virus on surfaces in hospital setting. *Letters in Applied Microbiology*. **34**: 189-193;

Carducci A., Casini B., Bani A., Rovini E., Verani M., Mazzoni F., (2003): Virological control of groundwater quality using biomolecular tests. *Water Sci. Technol.* 47(3): 261;

Carducci A., Gemelli C., Cantiani L. (1999): Assessment of microbial parameter as indicator of viral contamination of aerosol from urban sewage treatment plants. *Letters in Applied Microbiology*. 28: 207-210;

Carducci A., Cantiani L., Ruschi M. A. (1994): Contributo alla standardizzazione di metodiche per la concentrazione di Enterovirus da acque di mare. *Ig. Mod.*, 101: 707-721;

Carducci A., Verani M., Pizzi F., Rovini E., Casini B. (2005): Environmental virological monitoring for the epidemiological surveillance and risk assessment., 1st International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2005), vol. 1, pp. 101-105;

Carducci A., Zucchini A., Casini B., Cantiani L. (1997): Efficienza di metodi per l'analisi virologica di sedimenti marini: confronti. *Rivista Italiana d'Igiene* **57**: 191-197;

Carducci A., Casini B. (2004): Rischio biologico da agenti virali, XVII° Congresso Internazionale Ordine Nazionale dei Biologi "Professione biologo: aspetti attuali e prospettive future", vol. 1, pp. 39-50, Portorose (Slovenia);

Carter, M.J. (2005). Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection *Appl Microbiol* **98**:1354–1380;

Chan P. K., Chik K. W., Li C. K., Tang N. L., Ming M. S., Cheung J. L., Ng K. C., Yuen P. M., Cheng A. F. (2001): Prevalence and genotype distribution of TT

virus in various specimen types from thalassaemic patients. *Journal of Viral Hepatitis* **8**, 304-309;

Chen B.P., Rumi M.G., Colombo M. (1999): TTvirus is present in high frequency of italian hemophilic patients transfused with plasma-derived clotting factor concentrates. *Blood* **94**: 4333-4336

de Castro Amarante MF, Kashima S, Covas DT. (2007): TT virus (TTV) genotyping in blood donors and multiple transfused patients in Brazil. (In stampa)

Decreto Legislativo 25 gennaio (1992), n° 105. Attuazione della direttiva 80/777/CEE relativa all'utilizzazione e alla commercializzazione delle acque naturali: Gazzetta Ufficiale dell'Comunità Europea, n°L.229 del 30 agosto 1980

De Donno A., Liaci D., Bagordo F., Guido M., Carducci A. (2005): Evaluation of viral and bacterial contamination of coastal seawater. *Ig. Sanità Pubbl.* **61(6)**:585-600;

Devalle S., Niel C. (2004): Distribution of TT virus genomic groups 1-5 in brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV-1 infected patients. *Journal of Medical Virology* **72**, 133-173

Divizia M., Ruscio V., Degener A. M., Panà A. (1998). Hepatitis A virus detection in wastewater by RT and hybridization. *Microbiologica*, 21: 161-167

Donia D., Divizia M., Panà A. (1998). Analysis of concentration methods for bacteriophages. *L'igiene Moderna.*, 109: 475-482

Duizer E., Bijkerk P., Rockx B., de Groot A., Twisk F., Koopmans M., (2004): Inactivation of Caliciviruses. *Appl. and Environ. Microbiol.* 70: 4538-4543

Erker J.C., Leary T.P., Desai S.M., Chalmers M. I., Mushahwar I. K., (1999): Analyses of TT virus full-length genomic sequences. *Journal of General Virology* 80: 1743-1750

Enrquez C.E. and Gerba C.P., (1995): Concentration of enteric adenovirus 40 from tap, sea and environmental sample. *Water Research* 29:2554-2560

Fabiani M., Montacunelli R., Raponi M., Orsi G.B. (1999): Contaminazione batterica in un impianto di dialisi. *Annali di Igiene* 11: 107-116

Feachem, R.G., Bradley, D.J., Garelick, H., Mara D.D. (1983) Sanitation and disease: health aspects of excreta and wastewater management. John Wiley and sons Inc. New York, N.Y

Fong T.T., Lipp E.K.(2005): Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:357-371;

Fornai, C., Maggi, F., Vatteroni, M. L., Pistello, M., Bendinelli, M. (2001): High prevalence of TT virus (TTV) and TTV-like mini virus in cervical swabs. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2022-2024

Gallian P., Biagini P., Zhong S., Touinssi M., Yeo W., Cantaloube J. F., Attoui H., de Micco P., Johnson P. J., de Lamballerie X. (2000): TT virus: a study of molecular epidemiology and transmission of genotypes 1, 2 and 3. *Journal of Clinical Virology* 17, 43-49

Gantzer C., Schwartzbrod L. (2002): Enteroviruses: occurrence and persistence in the environment. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, 2338-2348. Wiley and Sons Publ., New York

Gantzer C., Senouci S., Maul A., Levi Y., and Schwartzbrod L., (1999): Enterovirus detection from wastewater by RT-PCR and cell culture. *Water Sci. Technol.* 40:105-109

Garson J.A., Tedder R.S., Briggs M., et al. (1990): Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by “nested” polymerase chain reactions and prediction of infectivity. *Lancet*. **335**: 1419-1422

Gassilloud B., Schwartzbrod L. and Gantzer C. (2003): Presence of Viral Genomes in Mineral Water: a Sufficient Condition To Assume Infectious Risk? *Appl Environ Microbiol.* 2003 July; 69(7): 3965–3969.

Gerba, C.P. (2000): Assessment of enteric pathogen shedding during recreational activities and its impact on water quality. *Quant.Microbiol.* **2**; 55-68

Gerner P., Oettinger R., Gerner W., Falbrede J., Wirth S. (2000): Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission. *Journal of Pediatric Infectious Diseases* **19**: 1074-1077

Gersberger M.R., Rose M.A., Robles-Sikisaka R., Dhar K. A., (2006) Quantitative detection of Hepatitis A Virus and enteroviruses near the United States-Mexico border and correlation with levels of fecal indicator bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*,72: 7438-7444

Grabow W.O.K. (2001): Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water SA*, 27(2): 251-268;

Greco M., Pasquarella C., Corvetti R., Cerbini I., Zuccherini F., Pitzurra M. (1988): Sorveglianza microbiologica ambientale e nei pazienti del C.T.M.O. di Perugia. In atti del 33° *Convegno nazionale della S.I.I.M.P.S.P. Milano 26-29-Aprile*

Grohmann, G. S.; Ashbolt, N. J.; Genova, M. S.; Logan, G.; Cox, P.; Kueh, C. S. W. (1993): Detection of viruses in coastal and river water systems in Sydney, Australia. *Water Sci. Technol* **27**:457-461;

Goglio A. (2002): Infezioni ospedaliere. In: atti II e III Convegno interdisciplinare, Bergamo 06-08-Giugno 2002

- Griffiths P. (1999):** Time to consider the concept of a commensal virus?
Reviews in Medical Virology 9: 73-74
- Haramoto E., Katayama H., Oguma K., Yamashita H., Nakajima E., Ohgaki S. (2005b):** One-year monthly monitoring of Torque teno virus (TTV) in wastewater treatment plants in Japan. *Water Research* **39**:2008-2013.
- Hijikata m., Takanashi K., Mishiro S., (1999):** Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* **260**: 17-22
- Hino S, Miyata H. (2007):** Torque teno virus (TTV): current status. *Rev Med Virol.* Jan-Feb;17(1):45-57
- Hot D., Legeay O., Jacques J., Gantzer C., Caudrelier Y., Guyard K., Lange M., Andreoletti L.(2003):** Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Res* **37**: 4703–4710;
- Inami T., Konomi N., Arakawa Y., Abe K., (2000):** High prevalence of TT Virus DNA in Human Saliva and Semen. *Journal of Clinical Microbiol.* Vol 38: 2407-2408
- Irshad M, Sharma Y, Dhar I, Singh J, Joshi YK (2006):** Transfusion-transmitted virus in association with hepatitis A-E viral infections in various forms of liver diseases in India *World J Gastroenterol* April 21;12(15):2432-2436
- Irshad M, Joshi YK, Sharma Y, Dhar I (2006):** Transfusion transmitted virus: A review on its molecular characteristics and role in medicine *World J Gastroenterol* **28**;12(32):5122-5134
- Irving, W. L., Ball, J. K., Berridge, S., Curran, R., Grabowska, A. M., Jameson, C. L., Neal, K. R., Ryder, S. D., Thomson, B. J. (1999):** TT virus infection

in patients with hepatitis C: frequency, persistence, and sequence herogeneity. *Journal of Infectious Diseases* 180: 27-34

Ischikawa T., Hamano Y. And Okamoto H.:l., (1999): Frequent detection of TT virus in throat swabs of pediatrie patients. *Infection*, 27: 298

Itox Y., Takahshi M., Ukita M., Nishizawa T., Okamoto H., (1999): Influence of primer on the detection of TT virus DNA by polymerase chain reaction. *Journal of Infectious Diseases* 180: 1750-1751

Jeilcic I., Hotz- Wagenblatt A., Hunzinker A., Zur Hausen H.. De Villier E.M., (2004). Isoltation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. *Journal of Virology* 78: 7498-7507

Jiang, S. C., R. Nobel, W. Chu. (2001): Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of southern California. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 179-184;

Kamada K., Kamahora T., Kabat P., Hino S., (2004): Transcriptional regulation of TT virus: promoter and enhancer regions in the 1.2-kb noncoding region. *Virology* 10: 341-348

Kamahora T., Hino S., Miyata H: (2000): Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells. *Journal of Virology* 74: 9980-9986

Kazi, A., Miyata, H., Kurokawa, K., Khan, M. A., Kamahora, T., Katamine, S., Hino, S. (2000): High frequency of postnatal transmission of TT virus in infancy. *Archivies of Virology* **145**: 535-540

Koopmans M, Von Bonsdorff C, Vinjè J, de Medici D, Monroe S. (2002): Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Rev* **26**:187-205

Labelle R. and Gerba C.P, (1979): Influence of pH, salinity, and organic matter on the adsorption of enteric viruses to estuarine sediment. *Appl. And Environ. Microbiol.* **38**:93-101;.

Li L., Shimizu H. Doan L.T, Tung P.G., Okitsu S., Nishio O., Suzuki E., Seo J.K., Kim K.S., Muller W.E., Ushijima H. (2004): Characterizations of Adenovirus Type 41 Isolates from Children with Acute Gastroenteritis in Japan, Vietnam, and Korea *J Clin Microbiol.* **42(9)**:4032-9;

Leclerc H., Schwartzbrod L., Die-Cas E. (2002). Microbial agents associated with waterborne disease. *Crit Rev Microbiol.* **28(4)** : 371-409

Lopman, B :A :, Reacher. M.H., Van Duinhoven. Y., Hanon F.X., Brown, D. and Koopmans, M. (2003). **Viral outbreaks in Europe, 1995-2000.** *Emerg.Infect.Dts*, **9**: 90-96

Maggi, F., Fornai, C., Vatteroni, M. L., Siciliano, G., Menichetti, F., Tascini, C., Specter, S., Pistello, M., Bendinelli, M. (2001): Low prevalence of TT virus in the cerebrospinal fluid of viremic patients with central nervous system disorders. *Journal of Medical Virology* **65**: 418-422

Maggi, F., Pifferi, Fornai, C., M., Andreoli, E., Tempestini, E., Vatteroni, M. L., Presciuttini, S., Marchi, S., Pietrobelli, S., Boner, A., Pistello, M., G., Bendinelli, M. (2003): TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory disease: relations to viremia and disease severity. *Journal of Virology* **77**: 2418-2425

Martinez, N. M., Garcia, F., Garcia, F., Alvarez, M., Bernal., M. C., Piedrola, G., Hernandez, J., Maroto, M. C. (2000): TT virus DNA in serum,

peripheral blood mononuclear cells and semen of patients infected by HIV. *AIDS* **14**: 1464-1466

Matsubara, H., Michitaka, K., Horiike, N., Yano, M., Fazle Akbar, S.M., Torisu, M., Onji, M. (2000): Existence of TT virus DNA in extracellular body fluids from normal healthy Japanese subjects. *Intervirology* **43**: 16-19

Mendez J., Jofre J., Lucena F., Contreras N., Mooijman K., Araujo R. (2002). Conservation of phage reference materials and water samples containing bacteriophages of enteric bacteria. *J. Virol. Methods.*, 106: 215-224

Metcalf, T.G.; Melnick, J.L. and Estes, M.K. (1995): Environmental Virology: From Detection of Viruses in Sewage and Waters by Isolation to Identification by Molecular Biology - A Trip of Over 50 Years. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 461-487

Miyamura, T. (2004): Identification of Basal Promoter and Enhancer elements in a untranslated region of the TT virus genome. *Journal of Virology* **78**: 10820-10824

Moloughney B.W. (2001): Transmission and postexposure management of blood-borne virus infections in the health care setting: *CMAJ* **165**: 445-451

Muljono, D. H., Nishizawa, T., Tsuda, F., Takahashi, M., Okamoto, H. (2001): Molecular epidemiology of TT virus (TTV) and characterization of two novel TTV genotypes in Indonesia. *Archives of Virology* **146**: 1249-1266

Mushahwar, I. K. (2000): Recently discovered blood-borne viruses: are they hepatitis viruses or merely endosymbionts? *Journal of Medical Virology* **62**: 399-404

Mushahwar, I. K., Erker, J. C., Muerhoff, A. S., Leary, T. P., Simons, J. N., Birkenmeyer, L. G., Chalmers, M. L., Pilot-Matias, T. J., Desai, S. M. (1999): Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 96: 3177-3182

Myrmel M., Berg E.M.M., Rimstad E. and Grinde B, (2004):Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Appl. Environ. Microbiol.*70:2678-2684

Nakagawa, N., Ikoma, J., Ishihara, T., Yasui-Kawamura, N., Fujita, N., Iwasa, M., Kaito, M., Watanabe, S., Adachi, Y. (2000): Biliary excretion of TT virus (TTV). *Journal of Medical Virology* 61: 462-467

Niel C., and Lampe E., (2001): High detection rates of TTV- like mini virus sequences in sera from Brazilian blood donors. *J. Med. Virol.*, 65: 199-205.

Niel C., Diniz-Mendes L. and Devalle S.,(2005):Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup *J Gen Virol* 86, 1343-1347

Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M. (1997): A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 241: 92-97

Noble, R.T. and Fuhrman, J.A. (2001): Enteroviruses detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction from the coastal waters of Santa Monica Bay, California: low correlation to bacterial indicator levels. *Hydrobiologia* 460: 175-184;

Okamoto H., Takahashi M., Nishizawa M., Ukita M., Fukuda M., Tsuda F., Miyakawa Y., Mayumi M. (1999): Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* **259**: 428-438

Okamoto, H., Nishizawa, T., Kato, N., Ukita, M., Ikeda, H., Iizuka, Y., Miyakawa, Y., Mayumi, M. (1998): Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology Research* 10:1-16

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, M., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y., Mayumi, M. (1999): Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* 259: 428-438

Okamoto, H., Fukuda, M., Tawara, A., Nishizawa, T., Itoh, Y., Hayasaka, I., Tsuda, F., Tanaka, T., Miyakawa, Y., Mayumi, M. (2000): Species-specific TT viruses and cross-species infection in nonhuman primates. *Journal of Virology* 74: 1132-1139

Okamoto, H., Mayumi, M. (2001): TT virus: virological and genomic characteristics and disease associations. *Journal of Gastroenterology* 36: 519-529

Oguchi T., Tanaka E., Orii K., Et Al. (1999): Transmission of and liver injury by TTvirus in patients on maintenance hemodialysis. *J. Gastroenterol.* **34**: 234-243

Osiowy C., Sauder C. (2000): Detection of TTvirus in human hair and skin. *Reseach.* **16**: 155-162

Pacini R., Morganti R., Contini C., Fatighenti P., Marinai G. (1998): Monitoraggio microbiologico di un'area materno infantile: protocollo di comportamento e risultati di un'indagine. *Microbiology Medicine* **13**: 565-568

Pancorbo, O. C., B. G. Evanshen, W. F. Campbell, S. Lambert, S. K. Curtis, and T. W. Woolley. (1987): Infectivity and antigenicity reduction rates of human *Rotavirus* Rotavirus strain Wa in fresh waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1803-1811.

Patti, A. M., F. A. Aulicino, A. L. Santi, M. Muscillo, P. Orsini, C. Bellucci, G. La Rosa, I. Mastroeni, and L. Volterra. (1996): Enteric virus pollution of Tyrrhenian areas. *Water Air Soil Pollut.* **88**:261-267;

Peng, Y. H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Ishikawa, T., Yoshikawa, A., Okamoto, H. (2002): Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Archives of Virology* **147**: 21-41

Piazza M., Borgia G., Picciotto L., Ciciarello S., Nappa S. (1994): HCV-RNA survival as detected by PCR in the environment. *Bollettino della Società Italiana Biologia Sperimentale* **70**: 167-170

Piazza M., Borgia G., Picciotto L., et al. (1995): Detection of hepatitis C virus-RNA by polymerase chain reaction in dental surgeries. *Journal of Medical Virology* **45**: 40-42

Pina S., Jofre J., Emerson S.V., Purcell R.M. and Girones R. (1998a) Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from an area where hepatitis E is not endemic. *App. Environ. Microbiol.* **64**:4485-4488

Pirovano, S., Bellinzoni, M., Ballerini, C., Cariani, E., Duse, M., Albertini, A., Imberti, L. (2002): Transmission of SEN virus from mothers to their babies. *Journal of Medical Virology* **66**: 421-427

Pitzurra M., Savino A., Pasquarella C. (1997): Il monitoraggio ambientale microbiologico (mam). *Annali di Igiene* **9**: 439-454

Puig M., Jofre J., Lucena F. et al. (1994): Detection of Adenoviruses and Enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Applied in Environmental Microbiology*, **60 (8)**: 2963-2970

Roggi C., Turconi G. (2003): Igiene degli alimenti e nutrizione umana. *Edizioni medico scientifiche internazionali, I ed., Roma*

Schroter, M., Polywka, S., Zollner, B., Schafer, P., Laufs, R., Feucht, H. H. (2000): Detection of TT virus DNA and GB virus type C/hepatitis G virus RNA in serum and breast milk: determination of mother-to-child transmission. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 745-747

Soby Ba., Simpson Acd., Ives Dp. (1993): Integrating public and scientific judgements into a tool kit for managing food-related risk, stage 1 : literature review and feasibility study. A report to the U.K. ministry of agriculture, fisheries and food. ERAU research report N°16, University of Anglia, Norwich.

Sobsey M.D., Et Al. (1998) : RT-PCR amplification detects inactivated virus in water and wastewater. *Water Scienze Technology* **38**: 91-94

Stark, K., Poggensee, G., Hohne, M., Bienzle, U., Kiwelu, I., Schreier, E. (2000): Seroepidemiology of TT virus, GBV-C/HGV, and hepatitis viruses B, C, and E among women in a rural area of Tanzania. *Journal of Medical Virology* **62**: 524-530

Suzuki, T., Suzuki, R., Li, J., Hijkata, M., Matsuda, M., Li, T. C., Matsuura, Y., Mishiro, S. Miyamura, T. (2004): Identification of Basal Promoter and Enhancer elements in a untraslated region of the TT virus genome. *Journal of Virology* **78**: 10820-10824

Takahashi, K., Iwasa, Y., Hijikata, M., Mishiro, S. (2000): Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Archives of Virology* 145: 979-993;

Tawara, A., Akahane, Y., Takahashi, M., Nishizawa, T., Ishikawa, T., Okamoto, H. (2000): Transmission of human TT virus of genotype 1a to chimpanzees with fecal supernatant or serum from patients with acute TTV infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 278: 470-476

Ukita, M., Okamoto, H., Kato, N., Miyakawa, Y., Mayumi, M. (1999): Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associate with acute and chronic non-A-G hepatitis. *Journal of Infectious Diseases* 179:1245-1248

Vaidya S.R., Shobha D.C. and Vidya A.A., (2002): Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis A, epatitis E and TT viruses in sawege from endemic area. *J.Hepatol*, 37:131-136

Vantarakis A., Tsibpuxi A., Venieri D., Komninou G., Athanassiadou A., Papapetropoulou M. (2005): Evaluation of microbiological quality of coastal waters in Greece *J Water Health* 03: 371-380;

Vasconcelos Hcf., Menezes Me., Niel C. (2001): TTV infection in children and adults who visited a general hospital in the south of Brasil for routine procedure. *Mem. Inst.Oswaldo Cruz* 96: 519-522

Verani M., Casini B., Battistini R., Pizzi F., Rovini E., Carducci A. (2005): One-year monthly monitoring of torque teno virus (TTV) in river water in Italy. *Water Science Technology*. Vol 54n° 3: 191- 195.

Verani M., Casini B., Battistini R., Carducci A. (2004): Un nuovo possibile indicatore del rischio virale occupazionale in ambienti sanitari. *Rivista Italiana di Igiene* 64: 298-310

Verzegnassi F., Buttignon S., Brumat A.M., Carfi A., Cattarin A., Gaviani D., Mian L., Venier C., Zorzet S.(2002): Le infezioni ospedaliere – Infezioni da HCV ed altri patogeni a trasmissione ematica, nei centri di dialisi. 1° Corso ItinerAnte 2002. Qualità tecnica, qualità relazionale nello specifico della dialisi?

Wallace BJ, Guzewich JJ, Cambridge M, Altekurse S, Morse DL. (1999): Seafood-associated disease outbreaks in New York, 1980-1994. *Am J Prev Med* 17:48-54

Wyn- Jones A.P. and Sellwood J., (2001): Enteric viruses in aquatic environment. *J Appl Microbiol* 91(6):945-62;

Ward, R. L., D. R. Knowlton, and P. E. Winston. (1986):. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:450-459.

Ward R.L., Bernstein D.I., Knowlton D.R., Sherwood J.R., Young E.C., Cusack T.M., Rubino J.R., (1991): Prevention of surface-to- human transmission of rotaviruses by treatment with disinfectant spray. *Journal of Clinical Microbiol.* 29:1991-1996

Wong, K.C., Leung K.S.(2004): rasmission and prevention of occupational infections in orthopaedic surgeons. *J Bone Joint Surg Am.* 86-A(5): 1065-76

Wyn-Jones A.P., Sellwood J. (2001): Enteric viruses in the aquatic environment. *J Appl Microbiol* 91(6):945-62;

Yates M.V.,Yates S.R. (1988): Modeling microbial fate in the subsurface environment. *Crit.Rev.Environ.Control* 17:307-344

Yokazaki S., Fukuda Y., Nakano I., Et Al. (1999): TTvirus : a mother to child transmitted rather than blood-borne virus. *Blood* 93: 3569-3570

8. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio innanzitutto la Prof.ssa Carducci per avermi permesso di frequentare il laboratorio con partecipazione attiva ai diversi progetti, permettendomi di impadronirmi delle metodologie applicate.

Ringrazio il Dottor Marco Verani per avermi incoraggiato e supportato nei miei momenti difficili e seguito durante il lavoro.

Un ringraziamento particolare va alle dottoresse Roberta, Francesca, Erika e Romilda, per avermi insegnato a muovermi in laboratorio e sopportato nei miei sfoghi non solo legati al lavoro ma anche personali.

Come dimenticare i bei momenti passati tra un campionamento e l'altro in compagnia di Yuri a cui manifesto il mio affetto per ogni tipo di supporto e incoraggiamento datomi, di Sandra e di Paola, con la quale ho vissuto i momenti tragici della stesura della tesi.

Ringrazio la mia famiglia per avermi permesso di studiare ed arrivare fino a qui, aiutandomi a superare ogni difficoltà e credendo in me..

Un grazie grande grande a tutti coloro che mi sono stati vicini nei miei anni di studio.

Ringrazio la sezione di Igiene del Dipartimento di Patologia Sperimentale dell'Università di Pisa per i dati relativi alle cariche batteriche e per il supporto durante i campionamenti.